

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Nepomuk Zöllner

VERGLEICH DER HEMMUNG DER LEBER- UND DÜNNDARMXANTHINOXIDASE
DER RATTE DURCH ALLOPURINOL UND OXIPURINOL IN VIVO UND IN VITRO

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Matthias Gottfried Münzer

aus
Großen-Buseck

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Zöllner

Mitberichterstatter: Professor Dr. W. Gröbner

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.1986

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
EINLEITUNG	1
ZIEL DER ARBEIT	4
MATERIAL UND METHODEN	
a) Präparation der Xanthinoxidase aus Leber und Dünndarm	6
b) Bestimmung und Berechnung der Xanthinoxidase-Aktivität	6
c) Proteinbestimmung	10
d) Hemmung der Xanthinoxidase durch Allopurinol und Oxipurinol in vivo und in vitro	12
ERGEBNISSE UND STATISTIK	
a) In vivo Versuche zur Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte	14
aa) Versuchsablauf	14
ab) Kurvenverlauf	14
ac) Tabellen	14
ad) Graphik	17
ae) Zusammenfassung der Ergebnisse	18
b) In vivo Versuche zur Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte	18
ba) Versuchsablauf	18
bb) Kurvenverlauf	18
bc) Tabellen	20
bd) Statistische Prüfung	28
be) Graphik	30
bf) Zusammenfassung der Ergebnisse	32
c) In vitro Versuche zur Dosisabhängigkeit der Allopurinol- und Oxipurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte	32
ca) Versuchsablauf	32
cb) Kurvenverlauf	33
cc) Tabellen	35
cd) Statistische Prüfung	40
ce) Graphik	41
cf) Zusammenfassung der Ergebnisse	44

DISKUSSION

a) Zur Methodik	45
aa) Zur Präparation der Xanthinoxidase	45
ab) Zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität	45
ac) Zur Berechnung der Xanthinoxidase-Aktivität	47
ad) Zum Kurvenverlauf bei der Bestimmung der Dosis- Wirkungsbeziehung	47
ae) Vergleich der Nativaktivitäten der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase mit entsprechenden Ergebnis- sen aus anderen Untersuchungen	49
b) Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vivo	52
c) Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vivo	53
d) Hemmbarkeit der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase der Ratte durch Allopurinol und Oxipurinol in vitro	54
e) Zum unterschiedlichen Einfluß von Allopurinol auf die endogene und die exogene Uratquote des Menschen	54
ZUSAMMENFASSUNG	58
LITERATURVERZEICHNIS	60
LEBENS LAUF	67
DANKSAGUNGEN	67

EINLEITUNG

Harnsäure entsteht in Leber- und Dünndarmschleimhaut des Menschen als Endabbauprodukt des Purinstoffwechsels:

-Im Rahmen des endogenen Turnovers werden täglich ca. 3,5 mmol Purinnucleotide zu ca. 600 mg Harnsäure abgebaut und durch Neusynthese ersetzt.

-Exogene, aus der Nahrung absorbierte Purine werden größtenteils noch in der Dünndarmschleimhaut zu Harnsäure metabolisiert (26). Die gebildete Harnsäure wird zu 2/3 über die Nieren und zu 1/3 über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden (30, 31).

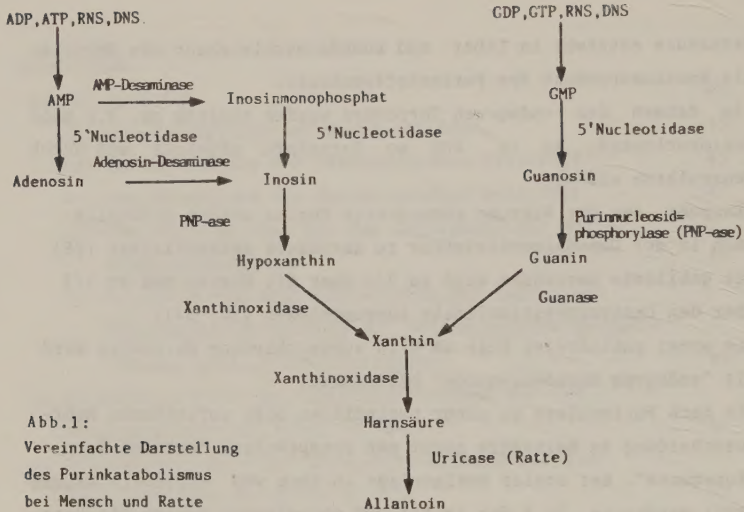
Die unter purinfreier Diät im Urin ausgeschiedene Harnsäure wird als "endogene Harnsäurequote" bezeichnet.

Die nach Purinzulage zu einer purinfreien Diät auftretende Mehrausscheidung an Harnsäure nennt man entsprechend "exogene Harnsäurequote". Bei oraler Purinzulage in Form von Ribonukleinsäure (RNS) werden ca. 50 % der in der RNS enthaltenen Purine als Harnsäure im Urin ausgeschieden (42).

Das seit ca. 1960 in die Therapie der Hyperurikämie und Gicht eingeführte Medikament Allopurinol hemmt das Enzym Xanthinoxidase, das die letzten beiden Schritte der Harnsäurebildung katalysiert, die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure (6, 7). Siehe hierzu Abb.1 (nach 26).

Allopurinol selbst wird von der Xanthinoxidase zu Oxipurinol oxidiert, das infolge seiner geringeren renalen Clearance im menschlichen Organismus akkumuliert und daher eine wesentlich längere Serumhalbwertszeit besitzt, und zwar 12-30 Stunden gegenüber 50-120 min bei Allopurinol (2 und 38). Bei der üblichen einmaligen Allopurinolgabe von 300 mg/die ist daher in erster Linie Oxipurinol für die Hemmung der Xanthinoxidase in vivo verantwortlich (6).

Beim Menschen ließ sich die endogene Harnsäurequote auch durch hohe Allopurinoldosen nicht wesentlich unter 50 % senken: Löffler u.a. (19) konnten mit einer täglichen Einmaldosis von 500 mg Allo-



purinol/m² Körperoberfläche (bei einem Normalgewicht von 70 kg entspricht dies etwa 850 mg Allopurinol/die bzw. 12 mg/kg Körpergewicht) die tägliche Harnsäureausscheidung nur auf 44 % des Ausgangswertes vermindern.

Bei Schweinen verabreichten Simmonds u.a.(29) noch wesentlich höhere Allopurinoldosen: selbst mit einer Maximaldosis von 510 mg/kg/die konnte die endogene Allantoinproduktion (Schweine besitzen wie Ratten das Enzym Uricase und können daher Harnsäure zu Allantoin abbauen, vergleiche Abb. 1) nicht unter 33 % des Ausgangswertes gesenkt werden.

Wurde purinfrei ernährten Versuchspersonen, die viermal täglich 100 mg Allopurinol einnahmen, 4 g RNS/die verabreicht, kam es lediglich zu einem geringen Anstieg der Harnsäureausscheidung: Im Gegensatz zur endogenen Harnsäurequote kann die exogene Harnsäurequote offensichtlich bereits durch übliche Allopurinoldosen fast vollständig eliminiert werden (41). Siehe hierzu Abb. 2.

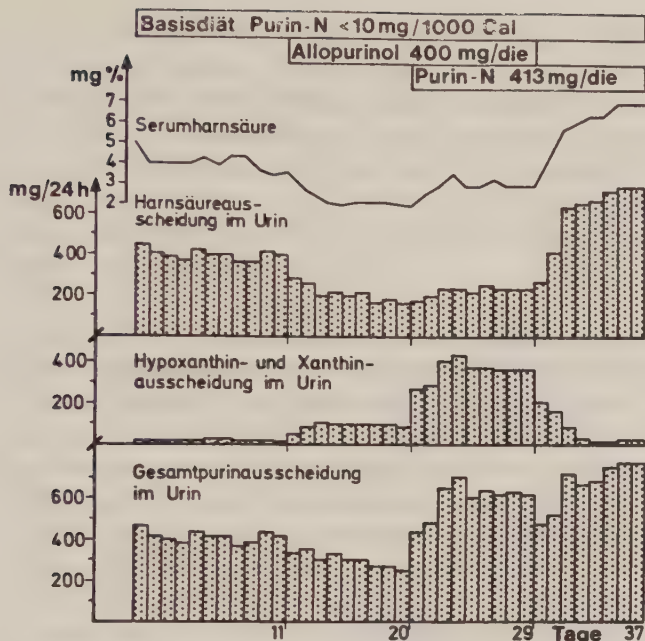


Abb.2: Serumharnsäure, renale Tagesausscheidung von Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin unter streng purinarmer Basisdiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und RNS sowie RNS allein (aus 41).

Aufgrund dieser Beobachtung wurde ein unterschiedlicher Effekt von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote postuliert und folgendermaßen zu erklären versucht (41):

Allopurinol sollte demnach in der Dünndarmmucosa, dem Resorptionsort nach oraler Verabreichung, eine höhere lokale Konzentration als in der Leber erreichen, wodurch die Xanthinoxidase des Dünndarms stärker gehemmt würde als die Leberxanthinoxidase. Die Leberxanthinoxidase wäre somit weiterhin in der Lage, einen Teil der endogen anfallenden Purine zu Harnsäure abzubauen. Die stärker bzw. vollständig gehemmte Xanthinoxidase des Dünndarms könnte demgegenüber aus exogenen, d.h. Nahrungspurinen, keine Harnsäure mehr bilden.

ZIEL DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, folgende in der Einleitung dargelegten Fragestellungen zu beantworten :

- 1) Beeinflußt Allopurinol die endogene und exogene Uratquote unterschiedlich ?
- 2) Ist eine vollständige Hemmung von Dünndarm- und Leberxanthinoxidase möglich ?

Zu 1) Es sollte die Hemmung der Xanthinoxidase-Aktivität von Leber (vermutlich vorwiegend verantwortlich für die endogene Uratquote) und Dünndarm (vermutlich vorwiegend verantwortlich für die exogene Uratquote) durch Allopurinol in vivo und in vitro gemessen und miteinander verglichen werden.

Da Leber- und Dünndarmgewebeproben von menschlichen Versuchspersonen im Rahmen eines Ernährungsversuchs nicht entnommen werden können, wurden die Versuche an Ratten durchgeführt.

Hierbei war zu beachten, daß die Allopurinolwirkung bei der Ratte offensichtlich wesentlich kürzere Zeit anhält als beim Menschen: Während beim Menschen die maximale Allopurinolwirkung erst nach 3- bis 5-tägiger Einnahme erreicht wird (6), konnten Strohmeyer u.a.(36) nach 10-tägiger Gabe einer sehr hohen Allopurinoldosis (45 mg/kg) bei Ratten keine Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase und nur eine geringe Hemmung der Leberxanthinoxidase nachweisen. Dieser Unterschied beruht höchstwahrscheinlich auf einer wesentlich kürzeren Serumhalbwertszeit von Oxipurinol bei der Ratte: Während Oxipurinol, der wirksame Hauptmetabolit von Allopurinol, beim Menschen aufgrund einer Serumhalbwertszeit von 18-30 Stunden akkumuliert und für die Langzeitwirkung von Allopurinol verantwortlich ist, wird er bei der Ratte offensichtlich sehr rasch ausgeschieden. Nach den von Nelson u.a. (23) angegebenen Plasmaspiegeln nach intravenöser Injektion von Allopurinol läßt sich eine Serumhalbwertszeit von Oxipurinol von weniger als 1 Stunde berechnen. Es sollte daher zunächst die Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase von Dünndarm und Leber

der Ratte nach oraler Gabe in vivo untersucht werden, um den Zeitpunkt der maximalen Allopurinolwirkung festzustellen. Sodann sollte zur Zeit der maximalen Allopurinolwirkung die Dosis-Wirkungsbeziehung für beide Organe untersucht werden.

In vitro sollte eine Dosis-Wirkungskurve für Allopurinol und Oxipurinol erstellt werden, um zu prüfen, ob die Xanthinoxidase-Aktivität in Leber und Dünndarm unabhängig von pharmakodynamischen Faktoren unterschiedlich gehemmt wird.

Zu 2) Nachdem die endogene Uratquote beim Menschen auch durch hohe Allopurinoldosen nur um etwas mehr als 50 % und beim Schwein durch die 40-fache Dosis nur um 67 % zu supprimieren war, sollte untersucht werden, ob eine vollständige Hemmung der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase bei der Ratte in vivo erzielt werden kann. Dann war zu prüfen, ob (wie beim Menschen vermutet) eine vollständige Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität bei erhaltener Restaktivität der Leberxanthinoxidase in vivo möglich ist.



MATERIAL UND METHODEN

a) Präparation der Xanthinoxidase aus Leber und Dünndarm

Da für die Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität keine international standardisierte Methode vorliegt, erfolgte die Enzympräparation in Anlehnung an Rowe und Wyngaarden (28) und an Della Corte und Stirpe (3).

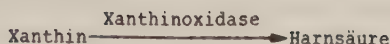
Nach der Entnahme aus der narkotisierten Ratte wurden Leber und Dünndarm zunächst von anhängendem Bindegewebe befreit und in eiskalter 0,15 M KCl-Lösung gespült. Dann wurde die gesamte Leber sowie die proximale Dünndarmhälfte mit einer Schere zerkleinert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei 0°-4°C.

Zunächst wurden die zerkleinerten Organe in 0,15 M KCl-Lösung (2 ml/g Leber bzw. 4 ml/g Dünndarm) mit einem Ultraturrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert, anschließend erfolgte ein weiterer Aufschluß der Homogenate mit einem Branson Sonifier B 12 (2 Min. auf Stufe 3-4) in einem Kunststoffgefäß im Eiswasserbad. Da die Xanthinoxidase ausschließlich im Cytosol lokalisiert ist (22) wurden die Homogenate zunächst 20 Min. bei 35 000 x g (Sorvall Superspeed RC 2-B mit SM 24 Rotor, 17 000 Upm) und die gewonnenen Überstände dann 60 min bei 100 000 x g abzentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman, Modell L 5-50 mit Ti 50 Rotor, 40 000 Upm). Nun wurde die auf den Überständen flottierende Lipidschicht abgesaugt und die verbleibenden Überstände in Vicking-Dialyserschläuchen 2 Stunden unter dauerndem Rühren gegen ein hundertfaches Volumen eiskalter 0,15 M KCl dialysiert.

Der dialysierte Überstand wurde zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität und der Proteinkonzentration verwendet.

b) Bestimmung und Berechnung der Xanthinoxidase-Aktivität

Die Xanthinoxidase-Aktivität wurde in Anlehnung an Della Corte und Stirpe (3) durch photometrische Registrierung der Reaktion



bestimmt. Bei 292 nm hat Xanthin nur eine geringe Extinktion, Harnsäure dagegen ihr Extinktionsmaximum. Aus der Extinktionszunahme bei 292 nm kann, unter Berücksichtigung der Extinktion von Xanthin, die Harnsäurebildung in $\mu\text{Mol} / \text{min}$ berechnet werden.

Der Reaktionsansatz zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität enthielt, auf 25°C temperiert:

1,2 ml 0,136 M Tris-HCl Puffer, pH 8,1

1,0 ml 90 μM Methylenblaulösung in 0,136 M Tris-HCl Puffer,
 pH 8,1 als Elektronenakzeptor,

0,6 ml 0,3 mM Xanthinlösung in 0,136 M Tris-HCl Puffer, pH 8,1

Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,2 ml dialysiertem, in Eiswasser gekühltem Überstand.

Die Referenzküvette enthielt statt 0,6 ml Xanthinlösung 0,6 ml 0,136 M Tris-HCl Puffer, pH 8,1

Endvolumen: 3ml; Endkonzentrationen: Tris-HCl Puffer 0,127 M, Xanthin 60 μM , Methylenblau 30 μM .

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Harnsäurebildung wurde bei 292 nm in einem Gilford Photometer 240 mit einem auf 25° C temperierten Vierfach-Küvettenhalter mit automatischem Küvettenwechsel gemessen. Der Reaktionsablauf wurde mit einem Gilford Schreiber registriert.

Es fand sich zunächst eine Phase kontinuierlich zunehmender Enzymaktivität entsprechend einer zunehmenden Steigung der Extinktionskurve ("lag phase"). Die Reaktionsgeschwindigkeit erreichte dann einen stabilen Maximalwert (V_{max}) entsprechend einem linearen Abschnitt der Extinktionskurve. Die Steigung dieses Kurvenabschnittes wurde der Berechnung der Xanthinoxidase-Aktivität zugrundegelegt (Tangente, s.u.). Die Inkubation wurde beendet, so-

bald die Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta E/t$) durch Substratverbrauch wieder abnahm und die Kurve in ein Plateau überging. Des-
sen Abstand von der Nulllinie wird im folgenden "Delta E maximal"
genannt. Eine Kurve zeigt Abb.3 :

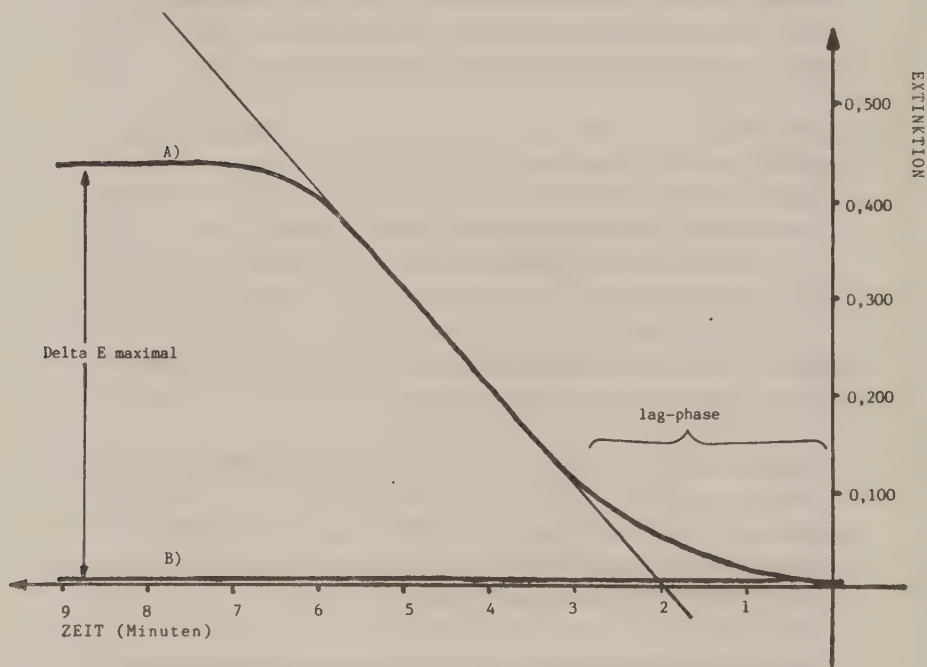


Abb.3: Typischer Kurvenverlauf bei der Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität. Kurve A: Leberxanthinoxidase einer Kontrollratte, die kein Allopurinol erhielt; Kurve B: Leerwert.

Berechnung der Xanthinoxidase-Aktivität:

Aus der am Photometer abgelesenen maximalen Extinktionsänderung $\Delta E/\text{min}$ wurde die Xanthinoxidase-Aktivität in Units berechnet, wobei 1 Unit definitionsgemäß 1 μmol Substrat in der Minute umsetzt.

Die Beziehung der Extinktion E einer Substanz in der Reaktionsküvette zu ihrer Konzentration ist definiert als

$$E = \epsilon \times c \times d$$

wobei

ϵ der molare Extinktionskoeffizient der Substanz für eine bestimmte Wellenlänge bei einem bestimmten pH-Wert,
 c die Konzentration der Substanz in der Küvette und
 d die Länge des Lichtwegs durch die Küvette (bei allen Versuchen 1 cm) ist.

Bei der Oxidation von Xanthin zu Harnsäure nimmt die Extinktion des Inkubationsansatzes um die Extinktion des umgesetzten Xanthins ab und um die Extinktion der gebildeten Harnsäure zu.

Der zugehörige molare Differenz-Extinktions-Koeffizient wurde von Jorgensen und Poulsen (14) mit 9574 l/mol x cm bei pH 8,1 und 292 nm bestimmt. Es gilt

$$\frac{\Delta E}{\text{min}} = 9574 \frac{\text{l}}{\text{mol} \times \text{cm}} \times \Delta c \frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{l}} \times d \text{ cm}$$

Da d stets = 1 war, ergibt sich für Δc :

$$\Delta c \frac{\text{mol}}{\text{l}} = \frac{\Delta E}{9574} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Von der Konzentration im Reaktionsansatz mit einem Volumen von 3 ml muß auf die Menge gebildeter Harnsäure in $\mu\text{mol/min}$ (Units) umgerechnet werden

$$U = \frac{\Delta E}{9574} \frac{\text{mmol}}{\text{ml} \times \text{min}} \times 3 \text{ ml}$$

$$U = \frac{\Delta E}{3191} \frac{\text{mmol}}{\text{min}}$$

$$U = \frac{\Delta E}{3,191} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

Die Extinktionsänderung $\Delta E/\text{min}$ durch 3,191 dividiert, ergibt die Harnsäurebildung in Units ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

d) Proteinbestimmung

Zur Berechnung der spezifischen Xanthinoxidase-Aktivität in Units/g Protein wurde die Proteinkonzentration der Enzympräparationen nach Lowry u.a. (20) bestimmt.

Eine 0,5 %ige $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ -Lösung wurde 1:1 mit einer 1 %igen K-Na-Tartrat-Lösung gemischt. 1 Teil dieser Lösung wurde zu 49 Teilen einer 2 %igen Na_2CO_3 -Lösung in 0,1 M NaOH gegeben. Zu 2 ml des resultierenden Reagenz "A" wurden 200 μl der zu untersuchenden Probe pipettiert.

Zunächst wurde eine Eichkurve erstellt: 100 mg Rinderalbumin wurden in 100 ml NaCl 0,9 % gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 3 Verdünnungen steigender Konzentration hergestellt: 5, 10, 20, ... 200 μl der Albuminlösung (Konzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden mit NaCl 0,9 % auf jeweils 200 μl aufgefüllt. Zu diesen Lösungen mit einem Gehalt von 5, 10, 20, ... 200 μg Rinderalbumin wurden jeweils in 200 μl NaCl gelöst, zu 2 ml Reagenz "A" gegeben, geschüttelt und 10 min stehengelassen. Danach wurden 200 μl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck), mit H_2O 1:2 verdünnt, dazugegeben und sofort geschüttelt. Nach weiteren 30 min Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde mit einem Beckman Photometer bei 498 nm die Extinktion bestimmt.

Abb.4 zeigt eine in der beschriebenen Weise angefertigte Eichkurve.

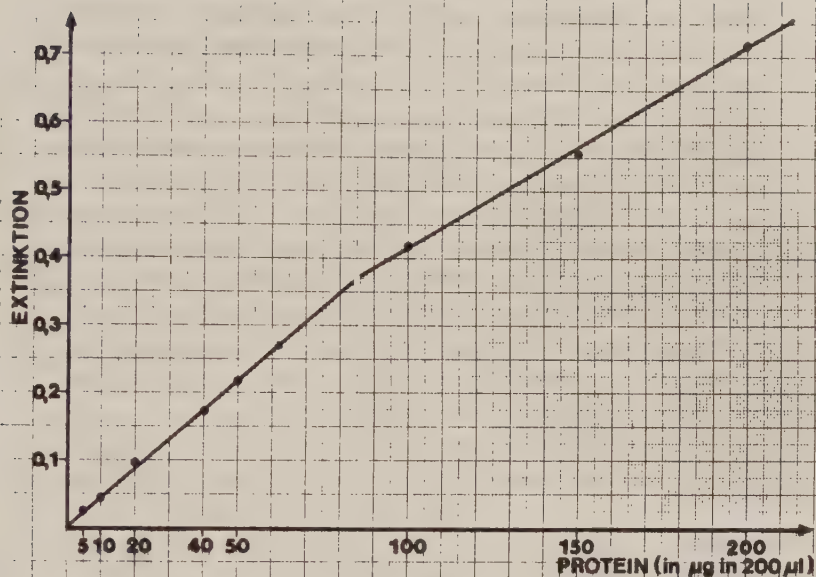


Abb.4: Eichkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Bestimmung der Proteinkonzentration in den Organpräparationen: Die Leber- und Dünndarmpräparationen wurden vorverdünnt, um die Extinktionen im linearen Bereich (Extinktionen 0-0,250) zu halten. 200 µl mit NaCl 0,9 % 1:110 verdünnter Leberüberstand oder

200 µl mit NaCl 0,9 % 1:60 verdünnter Dünndarmüberstand wurden zu 2 ml des Reagens "A" pipettiert und wie oben verarbeitet.

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Mittelwert zweier Extinktionen, z.B. 0,150, wurde in der Eichkurve aufgesucht und die korrespondierende Proteinmenge, in diesem Fall 34 µg, abgelesen. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (110 bei Leberüberstand, 60 bei Dünndarmüberstand), ergab sich die Proteinmenge in µg/200 µl Überstand.

Da zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität ebenfalls 200 µl

Überstand eingesetzt worden waren, konnte die Xanthinoxidase-Aktivität (in Units) direkt durch die in der Eichkurve abgelesene Proteinmenge (in μg) dividiert werden. Das Ergebnis war die spezifische Xanthinoxidase-Aktivität in Units/ μg Protein.

d) Hemmung der Xanthinoxidase durch Allopurinol und Oxipurinol in vivo und in vitro

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten der Süddeutschen Versuchstierfarm in Tuttlingen verwendet, deren Gewicht zur Zeit des Versuchs 180-240 g betrug. Sie erhielten handelsübliches Mischfutter und Wasser ad libitum.

Allopurinol in Pulverform wurde von der Deutschen Wellcome GmbH freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um die jeweilige Dosis peroral zu einem bestimmten Zeitpunkt applizieren zu können, wurde Allopurinol in Carboxymethylcellulose (20 g/l H_2O , nach 11) mittels eines Ultraschallhomogenisators (Branson Sonifier B 12) suspendiert und über einen 10 Charriere Nelaton-Katheter in den Magen der Ratte instilliert.

Zur Bestimmung des Zeitpunkts der maximalen Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase von Dünndarm und Leber erhielten 24 Ratten morgens über Magensonde 30 mg Allopurinol/kg Körpergewicht in Carboxymethylcellulose suspendiert, drei Ratten erhielten nur Carboxymethylcellulose. Nach 2, 5, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden wurden je drei Ratten mit Äther (Äther zur Narkose - Hoechst) narkotisiert und die Leber sowie die proximale Hälfte des Dünndarms zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität entnommen.

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde jeweils 6-12 Ratten 0,3 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 10 mg, 30 mg und 45 mg Allopurinol/kg Körpergewicht in der beschriebenen Verfahrungsweise verabreicht. Zum Zeitpunkt der maximalen Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase (nach 2,5 Stunden) wurden wiederum Leber und die proximale Hälfte des Dünndarms entnommen.

Für die in vitro Versuche wurden Leber und Dünndarm von unbehandelten Ratten entnommen und wie unter "Präparation der Xanthinoxidase" beschrieben verarbeitet.

Allopurinol oder Oxipurinol wurde in Konzentrationen von 0,5 - 100 μM dem Inkubationsansatz zugesetzt, indem 1,2 ml Pufferlösung durch 1,2 ml Inhibitor-Pufferlösung ersetzt wurde.

Es wurde eine 250 μM Allopurinol- oder Oxipurinollösung in 0,136 M Tris-HCl, pH 8,1 hergestellt und wie folgt mit Tris-HCl 0,136 M, pH 8,1 verdünnt:

250 μM Inhibitorlös. Pufferlösung Endkonzentration im Ansatz

(μl)	(μl)	(mM)
1200	----	0,1
600	600	0,05
120	1080	0,01
60	1140	0,005
12	1188	0,001
6	1194	0,0005

Die Reaktion wurde durch Zugabe des dialysierten Überstandes zum Reaktionsansatz, der Puffer, Methylenblau, Inhibitor und Xanthin enthielt, gestartet.

ERGEBNISSE

a) Ergebnisse der Versuche zur Zeitabhängigkeit der Allopurinol-wirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vivo

aa) Versuchsablauf

24 Ratten erhielten 30 mg Allopurinol/kg Körpergewicht in Carboxymethylcellulose suspendiert über eine Magensonde. Nach 2, 5, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden wurde jeweils drei Ratten Leber und Dünndarm entnommen und die Xanthinoxidase-Aktivität der Organe bestimmt.

Zum Zeitpunkt 0 wurden drei Ratten untersucht, die Carboxymethylcellulose ohne Allopurinol bekommen hatten. Diese Organpräparationen dienten als Kontrollen, ihre Aktivität wurde als 100 % gesetzt.

ab) Kurvenverlauf

Bei den Allopurinol-behandelten Ratten fand sich eine vom Zeitpunkt der Organentnahme abhängige Hemmung der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität. Diese Hemmung äußerte sich in einer Abnahme der Steigung des linearen Abschnitts der Extinktionskurve; ansonsten war die Form der Extinktionskurven unverändert, das Extinktionsmaximum war bei entsprechend langer Inkubationszeit in jedem Fall zu erreichen (vergl. Abb. 3 und 6).

ac) Tabellen

Auf den Tabellen der folgenden zwei Seiten (Tabellen 1 und 2) stehen in den Spalten:

1. der Zeitpunkt der Organentnahme,
2. die Nr. der jeweiligen Ratte,
3. der Mittelwert der abgelesenen Extinktionsänderungen
Delta E/min bei der Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität,
4. die Enzymaktivität im Reaktionsansatz in Units/3 ml
5. die Proteinkonzentrationen im Reaktionsansatz in mg/3 ml,
6. die spezifische Enzymaktivität in Units/g Protein und in
7. die spezifische Enzymaktivität in % der Kontrollaktivität
(Nach diesen Daten wurden die Graphiken angefertigt).

Tabelle 1

Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase-
Aktivität der Rattenleber in vivo nach oraler Gabe von 30 mg
Allopurinol / kg KG über Magensonde

Untersucht nach-- Stunden	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontroll= aktivität
0	1	0,200	0,0627	8,140	7,70	100,0
	2	0,184	0,0577	8,030	7,19	
	3	0,206	0,0646	8,140	7,94	
2	4	0,001	0,0003	7,590	0,04	0,20
	5	0,001	0,0003	8,380	0,04	
	6	0,002	0,0006	8,140	0,07	
5	7	0,002	0,0006	7,810	0,08	4,7
	8	0,004	0,0013	7,700	0,17	
	9	0,003	0,0009	8,140	0,11	
8	10	0,032	0,0100	8,359	1,20	15,2
	11	0,030	0,0094	8,360	1,12	
	12	0,031	0,0097	8,360	1,16	
12	13	0,036	0,0113	7,640	1,48	21,0
	14	0,041	0,0129	8,100	1,59	
	15	0,045	0,0141	8,140	1,73	
16	16	0,109	0,0342	8,690	3,94	55,7
	17	0,118	0,0370	8,200	4,51	
	18	0,101	0,0317	7,425	4,27	
20	19	0,124	0,0389	7,040	5,53	72,0
	20	0,123	0,0386	7,260	5,32	
	21	0,149	0,0467	8,360	5,59	
24	22	0,196	0,0614	7,810	7,86	105,8
	23	0,200	0,0627	7,590	8,26	
	24	0,200	0,0627	7,810	8,03	

Tabelle 2

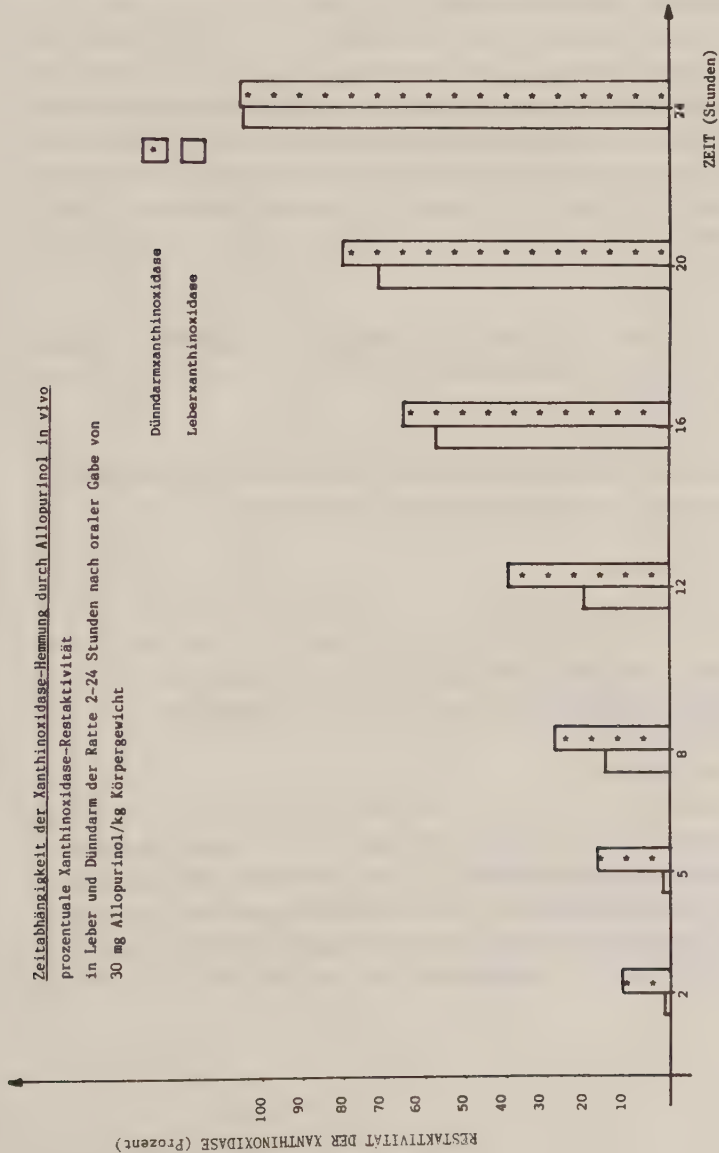
Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase-Aktivität des Rattendünndarms in vivo nach oraler Gabe von 30 mg Allopurinol / kg KG über Magensonde

Untersucht nach -- Stunden	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontrollaktivität
0	1	0,198	0,0621	2,007	30,94	100,0
	2	0,223	0,0699	2,020	34,60	
	3	0,226	0,0708	1,952	36,27	
2	4	0,020	0,0063	2,115	2,98	11,5
	5	0,034	0,0107	2,102	5,09	
	6	0,025	0,0078	2,156	3,61	
5	7	0,042	0,0132	1,870	7,06	18,5
	8	0,045	0,0141	2,129	6,62	
	9	0,032	0,0100	1,938	5,16	
8	10	0,068	0,0213	2,211	9,63	29,3
	11	0,070	0,0219	2,170	10,09	
	12	0,073	0,0229	2,266	10,11	
12	13	0,081	0,0254	2,056	12,35	38,7
	14	0,080	0,0251	1,897	13,23	
	15	0,090	0,0282	2,047	13,78	
16	16	0,122	0,0382	1,747	21,86	64,0
	17	0,122	0,0382	1,665	22,94	
	18	0,126	0,0395	1,938	20,38	
20	19	0,134	0,0420	1,815	23,14	81,7
	20	0,164	0,0514	1,774	28,97	
	21	0,195	0,0611	1,970	31,02	
24	22	0,210	0,0658	1,993	33,01	104,4
	23	0,236	0,0740	2,157	34,31	
	24	0,275	0,0862	2,211	38,99	

ac) Graphik

In der Abb.5 sind die Werte der Tabellen 1 und 2 dargestellt. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden aufgetragen, zu der die Organe entnommen wurden, auf der y-Achse die prozentuale Restaktivität der Xanthinoxidase. Gezeichnet ist der Median.

Abb.5: Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung:



ad) Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung

Die Hemmung der Leberxanthinoxidase war nach 2 Stunden und 5 Stunden mit 99,94 % und 99,85 % maximal. Während der ersten 12 Stunden lag sie über 50 %, um danach abzuklingen und nach 24 Stunden verschwunden zu sein.

Die Dünndarmxanthinoxidase war nach 2 Stunden am stärksten gehemmt, die verbleibende Aktivität von 11,5 % zeigt, daß das Enzym im Gegensatz zum Leberenzym durch die Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht nicht vollständig hemmbar ist. Die Dauer der Hemmung entsprach der Dauer der Hemmung der Leberxanthinoxidase : bis 12 Stunden betrug sie über 50 %, dann fiel sie ab, um nach 24 Stunden verschwunden zu sein

Ein Vergleich der Kontrollaktivitäten zeigt, daß die spezifische Aktivität der Xanthinoxidase im Dünndarm der Ratte 4- bis 5-fach höher ist als in der Leber.

b) Ergebnisse der Versuche zur Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vivo

ba) Versuchsablauf

6 bis 12 Ratten erhielten steigende Dosen Allopurinol (0,3-45 mg/kg KG) über eine Magensonde. Nach 2,5 Stunden wurden die Organe entnommen und die Xanthinoxidase-Aktivität bestimmt.

bb) Kurvenverlauf

Wie in Abb.3 dargestellt, nimmt bei der Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität in Abwesenheit von Allopurinol die Steigung der Extinktionskurve nach dem Start der Reaktion zunächst kontinuierlich zu ("lag-phase"); an diese Phase geringer Enzymaktivität schließt sich ein Zeitabschnitt mit konstanter maximaler Reakti-

onsgeschwindigkeit bzw. maximaler linearer Steigung an, der der Berechnung der Enzymaktivität zugrundegelegt wurde. Mit zunehmendem Substratverbrauch nimmt dann die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab, die Extinktionskurve flacht entsprechend ab und geht schließlich in ein Plateau über, das den Abschluß der Reaktion bei vollständigem Substratumsatz bedeutet. Die Hemmung der Xanthinoxidase durch Gabe von Allopurinol in vivo hängt von der Zeitspanne, die seit der Allopurinolgabe vergangen ist (siehe unter a)) und von der verabreichten Dosis ab. Das Ausmaß der jeweiligen Hemmung äußert sich in der Steigung des linearen Kurvenabschnittes, bei ausreichend langer Inkubationszeit läßt sich in jedem Fall das Extinktionsmaximum erreichen (vergl. Abb 6).

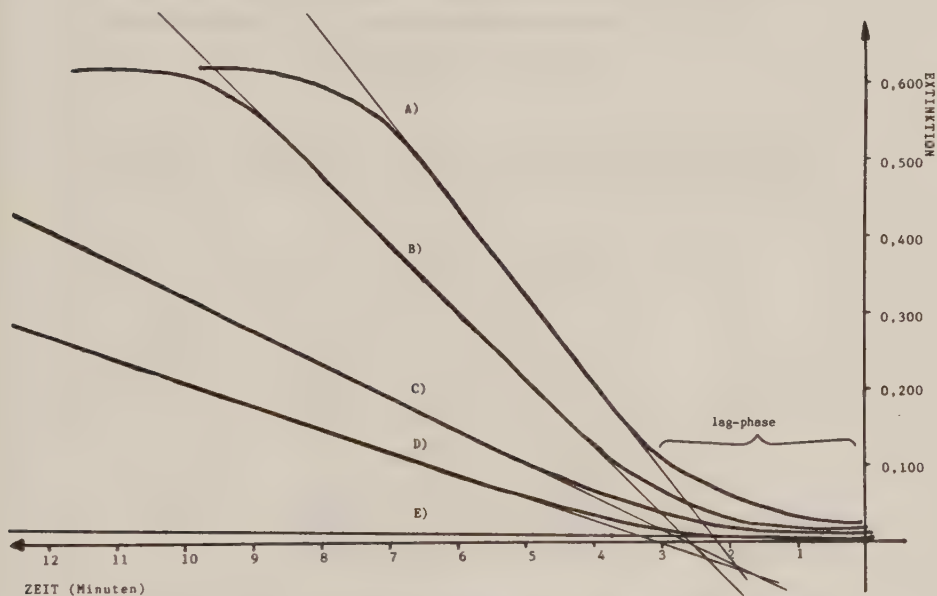


Abb.6: Abfall der Xanthinoxidase-Aktivität in Leber und Dünndarm der Ratte bei oraler Verabreichung steigender Allopurinolkonzentrationen. Kurve A: Kontrollratte, die kein Allopurinol erhielt; Kurve B: 0,3 mg Allopurinol/kg KG; Kurve C: 0,5 mg Allopurinol/kg KG; Kurve D: 1,5 mg Allopurinol/kg KG; Kurve E: 30 mg Allopurinol/kg KG

bc) Tabellen

Auf den Tabellen dieser und der folgenden Seiten (Tabellen 3-10) sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf Leber- und Dünndarmxanthinoxidase der Ratte in vivo dargestellt:

In Spalte 1 steht die Nummer der Ratte,
in Spalte 2 die abgelesene Extinktionsänderung Delta E/min,
in Spalte 3 die daraus errechnete Enzymaktivität in Units/3 ml.
In Spalte 4 ist der Proteingehalt des Ansatzes zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität in mg Prot/3 ml aufgeführt und in Spalte 5 die spezifische Enzymaktivität in Units/g Protein. Ganz rechts steht die prozentuale spezifische Aktivität in % der Aktivität des entsprechenden Organs der Kontrollratten.

Tabelle 3

Xanthinoxidase-Aktivität 2,5 Stunden nach Gabe von 0,3 mg Allopurinol/kg Körpergewicht oral

	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontroll= aktivität
Leber	1	0,040	0,0125	2,742	4,55	
	2	0,076	0,0238	3,947	6,03	
	3	0,061	0,0191	3,835	4,98	
	4	0,071	0,0223	3,584	6,22	$\bar{x} = 60$
Leber-	5	0,097	0,0304	3,378	9,00	
Kontrollen	6	0,108	0,0339	3,947	8,59	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,086	0,0270	1,556	17,35	
	2	0,089	0,0279	1,867	14,94	
	3	0,099	0,0310	1,357	22,84	
	4	0,078	0,0244	1,506	16,20	$\bar{x} = 86$
Dünndarm-	5	0,125	0,0392	1,843	21,27	
Kontrollen	6	0,115	0,0360	1,780	20,22	$\bar{x} = 100$

Tabelle 4

Xanthinoxidase-Aktivität 2,5 Stunden nach Gabe von 0,5 mg Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte	Delta	Units/	mg Prot/	Units/	Aktivität
	Nr.	E/min	3 ml	3 ml	g Prot	in % der
						Kontroll=
						aktivität
Leber	1	0,046	0,0144	3,994	3,61	32
	2	0,042	0,0132	4,017	3,29	29
	3	0,047	0,0147	3,812	3,86	34
	4	0,049	0,0154	4,085	3,77	33
	5	0,075	0,0235	3,903	6,02	53
	6	0,065	0,0204	3,287	6,21	55
	7	0,074	0,0232	3,834	6,05	54
	8	0,046	0,0144	3,332	4,32	38
						$\bar{x} = 41$
Leber-	9	0,116	0,0364	3,926	9,28	
Kontrollen	10	0,162	0,0508	4,177	12,16	
	11	0,143	0,0448	4,314	10,38	
	12	0,162	0,0508	3,692	13,76	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,052	0,0163	2,004	8,13	39
	2	0,030	0,0094	1,444	6,51	31
	3	0,030	0,0094	1,556	6,04	29
	4	0,064	0,0201	1,930	10,41	50
	5	0,082	0,0257	1,345	19,11	91
	6	0,044	0,0138	1,631	8,46	40
	7	0,048	0,0150	1,282	11,70	56
	8	0,068	0,0213	0,959	22,21	106
						$\bar{x} = 58$
Dünndarm-	9	0,112	0,0351	2,253	15,58	
Kontrollen	10	0,126	0,0395	2,067	19,11	
	11	0,124	0,0389	1,706	22,80	
	12	0,068	0,0213	1,618	13,16	
	13	0,098	0,0307	1,257	24,42	
	14	0,106	0,0332	1,407	23,60	$\bar{x} = 100$

Tabelle 5

Xanthinoxidase-Aktivität 2.5 Stunden nach Gabe von 1.0 mg Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontroll= aktivität
Leber	1	0,016	0,0050	4,108	1,22	11
	2	0,009	0,0028	3,629	0,77	7
	3	0,004	0,0013	3,515	0,37	3
	4	0,020	0,0063	3,332	1,89	17
	5	0,009	0,0028	3,424	0,82	8
	6	0,043	0,0135	3,355	4,02	37
	7	0,034	0,0107	3,583	2,93	28
	8	0,031	0,0097	3,561	2,72	25
						$\bar{x} = 17$
Leber- Kontrollen	9	0,120	0,0376	4,383	8,58	
	10	0,098	0,0307	3,994	7,69	
	11	0,131	0,0411	3,309	12,42	
	12	0,113	0,0354	3,857	9,18	
	13	0,144	0,0451	3,424	13,17	
	14	0,145	0,0454	3,401	13,35	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,070	0,0219	1,830	11,97	46
	2	0,028	0,0088	1,793	4,91	20
	3	0,055	0,0172	1,718	10,01	39
	4	0,057	0,0179	1,656	10,81	42
	6	0,065	0,0204	1,419	14,38	56
	7	0,074	0,0232	1,469	15,79	62
	8	0,046	0,0144	1,369	10,52	41
						$\bar{x} = 45$
Dünndarm- Kontrollen	9	0,121	0,0379	1,867	20,30	
	10	0,140	0,0439	1,743	25,19	
	11	0,143	0,0448	1,593	28,12	
	12	0,162	0,0508	1,319	38,51	$\bar{x} = 100$

Tabelle 6

Xanthinoxidase-Aktivität 2,5 Stunden nach Gabe von 1,5 mg
Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte	Delta	Units/	mg Prot/	Units/	Aktivität
	Nr.	E/min	3 ml	3 ml	g Prot	in % der
						Kontroll=
						aktivität
Leber	1	0,008	0,0025	3,880	0,64	6
	2	0,008	0,0025	3,903	0,64	6
	3	0,010	0,0031	3,675	0,84	8
	4	0,010	0,0031	3,766	0,82	8
	5	0,015	0,0047	3,994	1,18	11
	6	0,017	0,0053	3,743	1,42	13
	7	0,033	0,0103	3,720	2,77	26
	8	0,021	0,0066	3,949	1,67	16
						$\bar{x} = 12$
Leber- Kontrollen	9	0,155	0,0486	4,177	11,63	
	10	0,160	0,0501	4,086	12,26	
	11	0,132	0,0414	4,360	9,50	
	12	0,124	0,0389	4,040	9,63	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,032	0,0100	1,818	5,50	29
	2	0,036	0,0113	2,004	5,64	30
	3	0,039	0,0122	1,917	6,36	34
	4	0,028	0,0088	1,619	5,44	29
	5	0,044	0,0138	1,967	7,02	37
	6	0,024	0,0075	1,357	5,53	29
	7	0,039	0,0122	1,631	7,48	40
	8	0,050	0,0157	1,806	8,69	46
						$\bar{x} = 35$
Dünndarm- Kontrollen	9	0,124	0,0389	2,054	18,94	
	10	0,079	0,0248	1,556	15,94	
	11	0,117	0,0367	1,743	20,02	$\bar{x} = 100$

Tabelle 7

Xanthinoxidase-Aktivität 2,5 Stunden nach Gabe von 2,0 mg Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontroll= aktivität
Leber	1	0,012	0,0038	3,880	0,98	11
	2	0,004	0,0013	3,949	0,33	4
	3	0,002	0,0006	4,131	0,15	2
	4	0,001	0,0003	4,565	0,07	1
	5	0,002	0,0006	4,109	0,15	2
	6	0,004	0,0013	3,701	0,35	4
	7	0,004	0,0013	4,109	0,32	4
	8	0,004	0,0013	3,629	0,36	4
						$\bar{x} = 3,7$
Leber- Kontrollen	9	0,120	0,0376	4,382	8,58	
	10	0,098	0,0307	3,994	7,69	
	11	0,081	0,0254	3,492	7,27	
	12	0,131	0,0411	3,310	12,42	
	13	0,113	0,0354	3,386	10,45	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,046	0,0144	2,054	7,01	41
	2	0,043	0,0135	2,017	6,69	39
	3	0,047	0,0147	2,042	7,20	42
	4	0,023	0,0072	2,079	3,46	20
	5	0,026	0,0082	2,714	3,02	18
	6	0,028	0,0088	2,241	3,93	23
	7	0,035	0,0110	2,577	4,27	25
	8	0,037	0,0116	2,166	5,36	32
						$\bar{x} = 29$
Dünndarm- Kontrollen	9	0,112	0,0351	2,253	15,58	
	10	0,126	0,0395	2,067	19,11	
	11	0,118	0,0370	2,753	13,44	
	12	0,110	0,0345	1,905	18,11	
	13	0,124	0,0389	1,706	22,80	
	14	0,068	0,0213	1,618	13,16	$\bar{x} = 100$

Tabelle 8

Xanthinoxidase-Aktivität 2,5 Stunden nach Gabe von 10 mg Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte	Delta	Units/	mg Prot/	Units/	Aktivität
	Nr.	E/min	3 ml	3 ml	g Prot	in % der
						Kontroll=
						aktivität
Leber	1	0,007	0,0022	4,268	0,52	
	2	0,005	0,0016	3,835	0,42	
	3	0,001	0,0003	3,606	0,08	
	4	0,006	0,0019	3,949	0,48	
						$\bar{x} = 3,2$
Leber-	5	0,131	0,0411	3,684	11,16	
Kontrollen	6	0,147	0,0461	3,949	11,67	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,009	0,0028	1,606	1,74	
	2	0,011	0,0035	1,357	2,58	
	3	0,009	0,0028	1,205	2,32	
	4	0,012	0,0038	1,245	3,05	
						$\bar{x} = 20,5$
Dünndarm-	5	0,057	0,0179	1,631	10,97	
Kontrollen	6	0,065	0,0204	1,594	12,82	$\bar{x} = 100$

Tabelle 9

Xanthinoxidase-Aktivität 2.5 Stunden nach Gabe von 30 mg Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontroll= aktivität
Leber	1	0,001	0,0003	2,784	0,11	
	2	0,004	0,0013	3,949	0,33	
	3	0,003	0,0009	3,835	0,23	
	4	0,004	0,0013	3,584	0,36	
						$\bar{x} = 3,0$
Leber-	5	0,097	0,0304	3,378	9,00	
Kontrollen	6	0,100	0,0313	3,949	7,93	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,009	0,0028	1,556	1,80	
	2	0,006	0,0019	1,867	1,02	
	3	0,004	0,0013	1,357	0,96	
	4	0,005	0,0016	1,506	1,06	
						$\bar{x} = 2,8$
Dünndarm-	5	0,220	0,0689	1,843	37,38	
Kontrollen	6	0,196	0,0614	1,780	34,49	$\bar{x} = 100$

Tabelle 10

Xanthinoxidase-Aktivität 2,5 Stunden nach Gabe von 45 mg Allopurinol / kg Körpergewicht oral

	Ratte Nr.	Delta E/min	Units/ 3 ml	mg Prot/ 3 ml	Units/ g Prot	Aktivität in % der Kontroll aktivität
Leber	1	0,002	0,0006	3,378	0,18	
	2	0,004	0,0013	4,063	0,32	
	3	0,003	0,0009	3,355	0,27	
	4	0,004	0,0013	3,857	0,34	
						$\bar{x} = 2,8$
Leber-	5	0,103	0,0323	3,538	9,13	
Kontrollen	6	0,144	0,0451	3,127	14,42	$\bar{x} = 100$
Dünndarm	1	0,006	0,0019	1,494	1,27	
	2	0,002	0,0006	1,594	0,38	
	3	0,002	0,0006	1,556	0,39	
	4	0,005	0,0016	1,656	0,97	
						$\bar{x} = 2,7$
Dünndarm-	5	0,088	0,0276	1,469	18,79	
Kontrollen	6	0,115	0,0360	1,195	30,13	$\bar{x} = 100$

bd) Statistische Prüfung der Ergebnisse mit dem Wilcoxon-Vorzeichentest:

Um zu bestimmen, ob die Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase der Ratte nach oraler Gabe von Allopurinol signifikant größer ist als die der Leberxanthinoxidase wurde der Wilcoxon Vorzeichentest angewendet. Da Leber- und Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität jeweils bei derselben Ratte untersucht wurde, konnte der Wilcoxon-Sign-Test für paarige Beobachtungen angewendet werden.

Theorie des Wilcoxon-Sign-Tests (37):

Die Nullhypothese besagt, daß sich die Beobachtungspaare nicht unterscheiden, daß im vorliegenden Fall Leber- und Dünndarmxanthinoxidase gleich stark gehemmt werden. Bildet man für jede Ratte die Differenz aus Leber- und Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität bei einer bestimmten Allopurinoldosis, so müßten, wenn die Nullhypothese zutrifft, die Differenzen zur Hälfte positiv und zur Hälfte negativ, d.h. mit der Wahrscheinlichkeit 0,50 positiv und mit der Wahrscheinlichkeit 0,50 negativ sein. Überwiegen die positiven oder negativen Differenzen kann man sagen, daß eines der beiden Enzyme stärker gehemmt wird.

Die Anzahl der positiven und negativen Differenzen, die bei einer bestimmten Anzahl von Beobachtungen auftreten müssen, damit die Nullhypothese verworfen werden muß (die Signifikanzgrenzen), sind tabelliert.

Durchführung des Wilcoxon-Tests:

Hierzu wurde die Differenz zwischen Leber- und Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität gebildet. Waren beide Werte gleich, wurden sie weggelassen. Die Anzahl der positiven wie negativen Differenzen wurde zusammengezählt und mit einer tabellierten Prüfverteilung (37) verglichen.

Im vorliegenden Versuch war die Anzahl der Beobachtungen $N=8$, es wurde zweiseitig geprüft (es wurde sowohl geprüft, ob die Leberxanthinoxidase stärker gehemmt wird als die Dünndarmxanthinoxidase, als auch, ob sie schwächer gehemmt wird). Die Irrtumswahr-

scheinlichkeit sollte nicht größer sein als 1 %, d.h. es wurde auf dem 1 % Niveau geprüft.

Unter diesen Bedingungen lagen die Grenzwerte bei 1 und 7. Außerhalb dieser Schranken, bei mehr als 7 gleichen Differenzen und weniger als "einer gleichen Differenz", bestand also ein signifikanter Unterschied in der Hemmbarkeit der beiden Enzyme.

Wurde die Leberxanthinoxidase 8 mal stärker gehemmt als die Dünndarmxanthinoxidase und wurde die Dünndarmxanthinoxidase nie stärker gehemmt als die Leberxanthinoxidase, bedeutete das einen signifikanten Unterschied.

Bei den Konzentrationen 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg und 2,0 mg Allopurinol/kg KG war der Test wegen einer Fallzahl über 5 anwendbar, bei den übrigen verwendeten Konzentrationen (0,3 mg; 10 mg; 30 mg; 45 mg) nicht.

In den folgenden Tabellen sind die prozentuale Leber- und Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität und die Differenz aus beiden für jede Konzentration und für jede Ratte in Tabellen aufgeführt.

0,5 mg Allopurinol / kg KG 1,0 mg Allopurinol / kg KG

Ratte Nr.	Aktivität in % der Kontroll= aktivität von			Ratte Nr.	Aktivität in % der Kontroll= aktivität von		
	Leber	Dünndarm	Diff.		Leber	Dünndarm	Diff.
1	32	39	+7	1	11	46	+35
2	29	31	+2	2	7	20	+13
3	34	29	-5	3	3	39	+36
4	33	50	+17	4	17	42	+25
5	53	91	+37	5	8	53	+45
6	55	40	-15	6	37	56	+19
7	54	56	+2	7	28	62	+44
8	38	106	+68	8	25	41	+16

2 negative und 6 positive
Differenzen

8 positive Differenzen

1,5 mg Allopurinol / kg KG 2,0 mg Allopurinol / kg KG

Aktivität in % der Kontroll=				Aktivität in % der Kontroll=			
Ratte	aktivität von			Ratte	aktivität von		
Nr.	Leber	Dünndarm	Diff.	Nr.	Leber	Dünndarm	Diff.
1	6	29	+23	1	12	42	+30
2	6	30	+24	2	4	40	+36
3	8	34	+26	3	2	43	+39
4	8	29	+21	4	1	20	+19
5	11	37	+26	5	2	18	+16
6	13	29	+16	6	4	23	+19
7	26	40	+14	7	4	25	+21
8	16	46	+30	8	4	32	+28

8 positive Differenzen

8 postive Differenzen

Bei 1,0 mg, 1,5 mg und 2,0 mg Allopurinol/kg KG fanden sich 8 positive Differenzen. Da die Signifikanzgrenzen bei 1 und 7 liegen (37), fallen 8 positive Differenzen außerhalb dieser Grenzen. Die Leberxanthinoxidase wurde somit also bei 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg statistisch auf dem 1% Niveau signifikant stärker gehemmt als die Dünndarmxanthinoxidase.

Eine Prüfung auf dem 5 % Niveau hätte zum gleichen Ergebnis geführt.

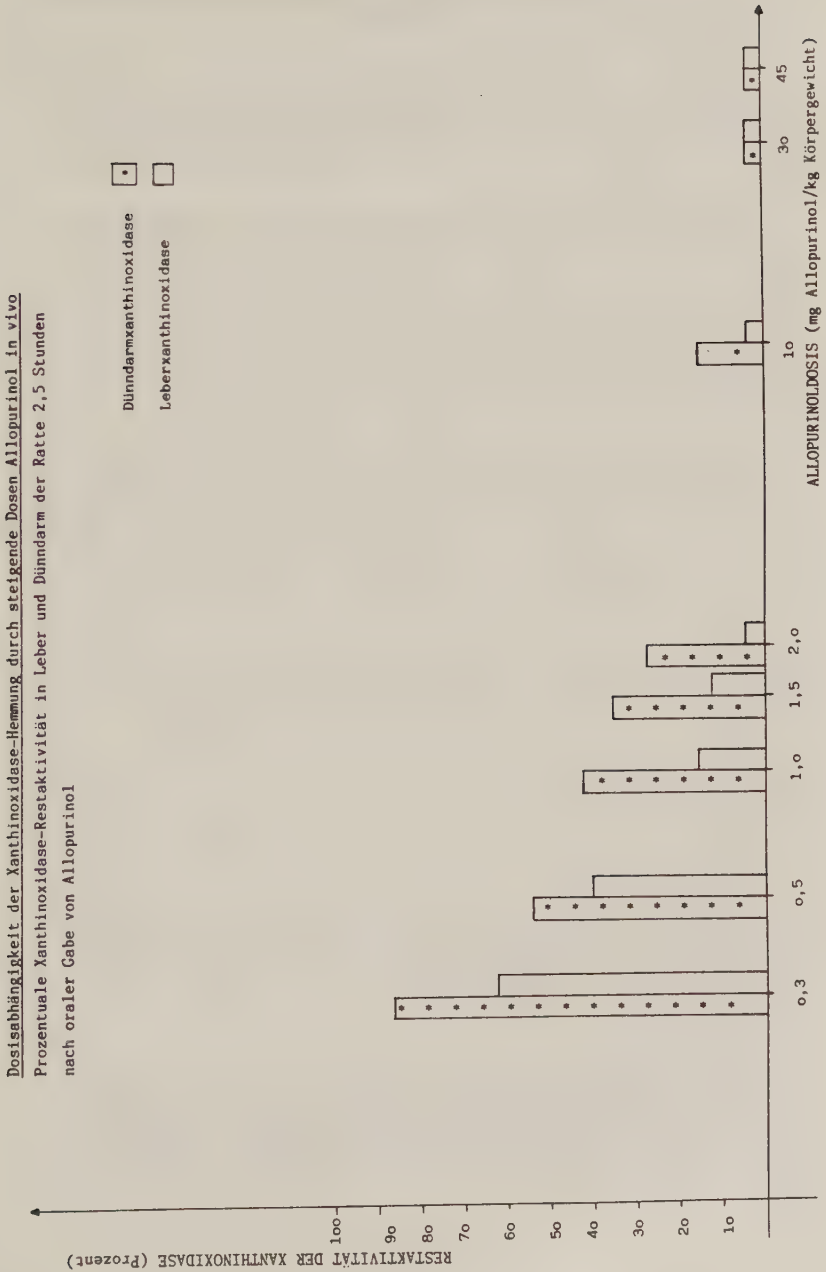
be) Graphik

Die Ergebnisse der Tabellen 3 bis 10 sind in der Abbildung 7 dargestellt: auf der y-Achse sind die Xanthinoxidase-Aktivitäten in % der Kontrollaktivität aufgetragen, auf der x-Achse die zugehörigen Allopurinoldosen in mg/kg KG.

Die x-Achse ist logarithmisch unterteilt, die y-Achse linear, die Graphik ist somit eine halblogarithmische Darstellung.

Gezeichnet ist der Median der jeweiligen Gruppe.

Abb.7: Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung in vivo



bf) Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung

2,5 Stunden nach oraler Gabe einer Allopurinol-Dosis von 0,5 mg/kg KG lag die Leberxanthinoxidase-Aktivität unter 50 %, nach Verabreichung von 2,0 mg Allopurinol/kg KG unter 5 % der Kontrollaktivität.

Die Dünndarmxanthinoxidase-Aktivität betrug bei 1,0 mg/kg KG weniger als 50 % der Ausgangsaktivität und war erst bei 30 mg Allopurinol/kg KG fast vollständig gehemmt (Restaktivität unter 5 %). Bei den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung in vivo war dagegen nach der Gabe von 30 mg Allopurinol/kg KG nach 2 Stunden noch eine Restaktivität von 11,5 % verblieben.

Die Leberxanthinoxidase wurde durch oral verabreichtes Allopurinol stärker gehemmt als die Dünndarmxanthinoxidase. Bei der oralen Gabe von 1,0 mg, 1,5 mg und 2,0 mg Allopurinol/kg KG war der Unterschied statistisch auf dem 1 %-Niveau signifikant, bei den übrigen Konzentrationen konnte der Test nicht angewendet werden.

Die Durchschnittswerte für die spezifische Xanthinoxidase-Aktivität (in Units/g Protein) von Leber und Dünndarm aller unbehandelten Ratten (Kontrollen in den Tabellen 1 bis 10) betrugen :

	Leber	Dünndarm
Xanthinoxidaseaktivität		
(μ mol Harnsäure/g Protein x min)	$9,9 \pm 2,1$	$21,1 \pm 7,9$

c) Ergebnisse der Versuche zur Dosisabhängigkeit der Allopurinol- und Oxipurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vitro

ca) Versuchsablauf

Leber und Dünndarm wurden nicht vorbehandelten Ratten entnommen und wie unter "Methoden, a)" zur Xanthinoxidasebestimmung aufgearbeitet. Den Präparationen wurde in vitro Allopurinol oder Oxi-

purinol in steigenden Konzentrationen (0,5-100 μM) zugesetzt und die Xanthinoxidaseaktivität wie unter "Methoden, b)" bestimmt.

Es sollte festgestellt werden, ob die Xanthinoxidase aus Leber und Dünndarm - unbeeinflusst von Faktoren wie Durchblutung, Absorption oder Akkumulation in bestimmten Organen - durch Allopurinol oder Oxipurinol unterschiedlich hemmbar ist.

cb) Kurvenverlauf bei der Bestimmung der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase-Aktivität in vitro

Gegenüber den Untersuchungen der Allopurinolwirkung in vivo ergaben sich bei der Bestimmung der Xanthinoxidasehemmung durch Allopurinol bzw. Oxipurinol in vitro wesentliche Unterschiede: nach Verabreichung von Allopurinol in vivo fand sich eine von der Dosis und dem Entnahmezeitpunkt abhängige konstante Restaktivität der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase entsprechend dem Anteil freier, nicht mit Oxipurinol pseudoirreversibel verbundener Enzymmoleküle (vergl. Abb.6). Nach Zusatz von Allopurinol bzw. Oxipurinol in vitro kommt es dagegen zu einer langsam fortschreitenden Inaktivierung des Enzyms: entsprechend der stöchiometrischen 1:1-Bindung von Oxipurinol und Xanthinoxidase und der resultierenden "Titrierbarkeit" des Enzyms mit Oxipurinol (33) läßt sich eine vollständige Inaktivierung der Xanthinoxidase in vitro mit Allopurinol- bzw. Oxipurinolkonzentrationen erreichen, die der eingesetzten Konzentration von Enzymmolekülen entsprechen. Die vollständige Inaktivierung der Xanthinoxidase läßt sich daher nicht zur Bestimmung von K_i -Werten heranziehen. Vergleichende Untersuchungen über die Hemmbarkeit der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vitro müssen daher vom Einfluß von Allopurinol bzw. Oxipurinol auf die Maximalgeschwindigkeit der Xanthinoxidasereaktion ausgehen. Diese tritt im Anschluß an die "lag phase" auf und wird aus der Steigung der Tangente in diesem Punkt der Extinktionskurve berechnet. Wie man in Abb. 8 erkennen kann, nimmt mit steigender Allopurinol- bzw. Oxipurinolkonzentration die anfängliche Maximalgeschwindigkeit der Xanthinoxidasereaktion ab, gleichzeitig kommt es zu einer zunehmend rascheren Inaktivie-

rung der Xanthinoxidase; die Steigung der Extinktionskurve nimmt kontinuierlich auf 0 ab, die Kurve erreicht ein Plateau, dessen Extinktionswert mit steigender Allopurinol- bzw. Oxipurinolkonzentration immer weiter unter dem maximal erreichbaren Extinktionswert bei vollständigem Substratumsatz liegt. Nachdem auch die Hemmung der Maximalgeschwindigkeit auf einer pseudoirreversiblen Inaktivierung der Xanthinoxidase beruht, erlaubt sie nur die Bestimmung einer scheinbaren Hemmkonstante.

Die in den folgenden Tabellen angegeben (Rest-)Aktivitäten der Xanthinoxidase nach Zusatz von Allopurinol bzw. Oxipurinol in vitro beziehen sich aus den genannten Gründen auf die Maximalgeschwindigkeit der Xanthinoxidase.

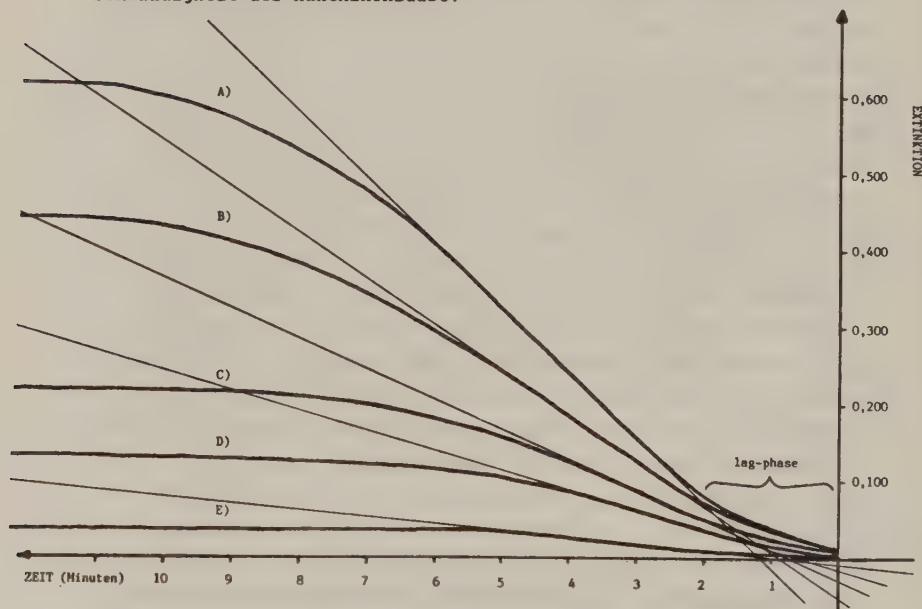


Abb.8: Xanthinoxidaseaktivität im Rattendünndarm bei Zusatz steigender Inhibitorkonzentrationen zum Inkubationsansatz.

Kurve A: Kontrolle; Kurve B: Zusatz von 0,005 mM Oxipurinol; Kurve C: Zusatz von 0,01 mM Oxipurinol; Kurve D: Zusatz von 0,05 mM Oxipurinol; Kurve E: Zusatz von 0,1 mM Oxipurinol.

Die Steigungen der Tangenten dienen zur Berechnung der Xanthinoxidaseaktivität in Units/min.

cc) Tabellen

In den folgenden Tabellen finden sich die Xanthinoxidase-Aktivitäten von Leber- und Dünndarmpräparationen nicht vorbehandelter Ratten, denen in vitro Allopurinol oder Oxipurinol in steigenden Konzentrationen (0,5-100 μM) zugesetzt wurde.

In den oberen Hälften der Tabellen sind die Extinktionszunahmen $\Delta E/\text{min}$ in den Ansätzen zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität unter den jeweiligen Inhibitorkonzentrationen aufgeführt.

In den unteren Hälften der Tabellen sind die entsprechenden Restaktivitäten in % der Kontrollaktivitäten aufgelistet.

Tabelle 12

Xanthinoxidase-Aktivität nach Zusatz von Allopurinol zu Leberpräparationen

a) Extinktionszunahme Delta E/min

Ratte	Allopurinolkonzentration im Reaktionsansatz in μM :								
Nr.	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	50.0	100.0
1	0,181	0,160	0,146	---	0,067	---	0,000	---	---
2	0,156	0,149	0,118	---	0,034	---	0,014	---	---
3	0,230	0,211	0,186	---	0,060	---	0,000	---	---
4	0,112	---	0,081	0,062	0,051	0,036	0,000	---	---
5	0,138	---	0,089	0,073	0,054	0,052	0,044	---	---
6	0,107	---	0,085	0,083	0,052	0,048	0,027	0,000	---
7	0,105	0,102	0,095	0,084	0,073	0,057	0,049	0,005	---
8	0,128	0,110	0,104	0,082	0,056	0,056	0,045	0,013	0,000
9	0,101	0,094	0,086	0,072	0,045	0,033	0,031	0,008	0,000
10	0,095	0,087	0,073	0,063	0,043	0,040	0,029	0,000	0,000

Median 0,120 0,110 0,095 0,073 0,052 0,050 0,021 0,005 0,000

b) Xanthinoxidase-Aktivität in % der Kontrollaktivität

Ratte	Allopurinolkonzentration im Reaktionsansatz in μM :								
Nr.	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	50.0	100.0
1	100	88	81	--	37	--	0	--	--
2	100	96	76	--	22	--	9	--	--
3	100	92	81	--	26	--	0	--	--
4	100	--	72	55	45	32	0	--	--
5	100	--	65	53	39	38	32	--	--
6	100	--	80	78	48	45	25	0	--
7	100	97	90	80	70	54	47	5	0
8	100	86	81	64	44	44	35	10	0
9	100	93	85	72	45	33	31	8	0
10	100	91	77	66	45	42	30	0	--
Median	100	92	81	66	45	42	27,5	5	0

Tabelle 13

Xanthinoxidase-Aktivität nach Zusatz von Allopurinol zu Dünndarmpräparationen

a) Extinktionszunahme Delta E/min

Ratte Allopurinolkonzentration im Ansatz in μM :

Nr.	0,0	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	50,0	100,0
1	0,162	0,146	0,140	---	0,042	---	0,006	0,000	---
2	0,168	0,156	0,132	---	0,064	---	0,012	0,000	---
3	0,088	---	0,070	0,059	0,047	0,030	0,017	0,000	---
4	0,082	---	0,068	0,048	0,043	0,026	0,012	0,000	---
5	0,081	0,064	0,064	0,055	0,044	0,030	0,014	0,000	---
6	0,078	0,064	0,064	0,052	0,042	0,021	0,020	0,010	0,000
7	0,084	0,069	0,065	0,056	0,043	0,039	0,026	0,015	0,000
8	0,077	0,067	0,065	0,052	0,039	0,036	0,014	0,000	---

Median 0,083 0,068 0,065 0,055 0,043 0,030 0,014 0,000 0,00

b) Xanthinoxidase-Aktivität in % der Kontrollaktivität

Ratte Allopurinolkonzentration im Ansatz in μM :

Nr.	0,0	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	50,0	100,0
1	100	90	86	--	26	--	4	0	--
2	100	93	78	--	38	--	7	0	--
3	100	--	80	67	53	34	19	--	--
4	100	--	83	58	52	32	15	0	--
5	100	79	79	68	54	37	17	0	--
6	100	82	82	67	54	27	26	13	0
7	100	87	84	67	51	46	31	18	0
8	100	87	84	67	51	47	18	0	--

Median 100 87 82 67 51,7 35,5 17,5 0 0

Tabelle 14

Xanthinoxidase-Aktivität nach Zusatz von Oxipurinol zu Leberpräparationen

a) Extinktionszunahme Delta E/min

Ratte	Oxipurinolkonzentration im Ansatz in μM :								
Nr.	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	50.0	100.0
1	0,180	0,175	0,162	---	0,138	---	0,102	0,014	0,000
2	0,156	0,162	0,162	---	0,124	---	0,080	0,000	---
3	0,230	0,211	0,201	---	0,104	---	0,124	0,031	0,000
4	0,099	0,096	0,091	0,080	0,068	0,063	0,051	0,035	0,010
5	0,150	---	0,084	0,090	0,083	0,063	0,055	0,035	0,021
6	0,156	---	0,100	0,085	0,077	0,063	0,056	0,032	0,015
7	0,105	0,104	0,096	0,085	0,081	0,055	0,051	0,019	0,012
8	0,128	0,115	0,115	0,097	0,082	0,075	0,063	0,025	0,020
9	0,101	0,095	0,094	0,083	0,062	0,050	0,052	0,016	0,006
10	0,095	0,089	0,090	0,079	0,066	0,052	0,049	0,015	0,007

Median 0,139 0,109 0,098 0,085 0,081 0,063 0,055 0,022 0,007

b) Xanthinoxidase-Aktivität in % der Kontrollaktivität

Ratte	Oxipurinolkonzentration im Ansatz in μM :								
Nr.	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	50.0	100.0
1	100	97	90	--	77	--	57	8	0
2	100	104	104	--	80	--	51	0	0
3	100	91	87	--	45	--	54	13	0
4	100	97	92	81	69	64	52	35	10
5	100	--	56	60	55	42	36	23	14
6	100	--	64	54	49	40	36	20	10
7	100	99	91	81	77	52	48	18	11
8	100	90	90	76	64	58	49	20	16
9	100	94	93	83	62	50	52	16	6
10	100	90	95	83	69	55	58	16	7

Median 100 95,5 90 81 67 52 51,5 17 8,5

Tabelle 15

Xanthinoxidase-Aktivität nach Zusatz von Oxipurinol zu Dünndarmpräparationen

a) Extinktionszunahme Delta E/min

Ratte Oxipurinolkonzentration im Ansatz in μM :

Nr.	0,0	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	50,0	100,0
1	0,160	0,148	0,146	---	0,124	---	0,095	0,042	0,000
2	0,158	0,155	0,150	---	0,118	---	0,094	0,044	0,000
3	0,075	---	0,075	0,068	0,060	0,058	0,050	0,030	0,019
4	0,087	---	0,073	0,066	0,056	0,055	0,057	0,040	0,022
5	0,081	0,071	0,073	0,061	0,050	0,047	0,047	0,026	0,016
6	0,078	0,073	0,065	0,061	0,053	0,051	0,047	0,021	0,016
7	0,084	0,080	0,072	0,070	0,061	0,054	0,050	0,020	0,015
8	0,077	0,077	0,073	0,067	0,060	0,050	0,047	0,022	0,016

Median 0,085 0,079 0,073 0,066 0,060 0,053 0,050 0,028 0,016

b) Xanthinoxidase-Aktivität in % der Kontrollaktivität

Ratte Oxipurinolkonzentration im Ansatz in μM :

Nr.	0,0	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	50,0	100,0
1	100	92	91	--	78	--	59	28	0
2	100	98	95	--	75	--	59	28	0
3	100	--	100	91	80	77	66	40	6
4	100	--	84	76	64	63	65	46	25
5	100	87	90	76	62	58	58	32	20
6	100	94	83	78	68	65	60	27	20
7	100	95	86	83	73	64	60	24	18
8	100	100	95	87	78	65	61	28	21

Median 100 94 91 80 74 65 60 30 19

cd) Statistische Prüfung mit dem Wilcoxon-Vorzeichentest:

Die Mediane der prozentualen Restaktivitäten der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase aus Tabellen 12 und 13 wurden mit dem Wilcoxon Vorzeichentest geprüft, um festzustellen, ob Allopurinol in vitro über eine weite Spanne von Konzentrationen (0,5-100 μM) hinweg die Leberxanthinoxidase stärker oder schwächer hemmt als die Dünndarmxanthinoxidase.

	Allopurinolkonzentrationen im Ansatz in μM :								
	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	50.0	100.0
Leber	100	92	80,5	66	44,5	42	27,5	5	0
Dünnd.	100	87	82,5	67	51,5	35,5	17,5	0	0
Diff.	0	+5	-2	-1	-7	+6,5	+10	+5	0

Bei $N = 8$ ergaben sich 4 positive und 3 negative Differenzen. Diese Werte liegen innerhalb der Signifikanzgrenzen, es bestand kein Unterschied in der Hemmbarkeit von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase unter Allopurinol in vitro auf dem 1 % Niveau.

Die Mediane der prozentualen Restaktivitäten der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase aus den Tabellen 14 und 15 (nach Zusatz von Oxipurinol in vitro) wurden wie oben mit dem Wilcoxon-Vorzeichentest geprüft:

	Oxipurinolkonzentrationen im Ansatz in μM :								
	0.0	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	50.0	100.0
Leber	100	95,5	90	81	67	52	51,5	17	8,5
Dünndarm	100	94	91	80	74	65	60	30	19
Differenz	0	+1,5	-1	+1	-7	-13	-8,5	-13	-11,5

2 positive Differenzen und 6 negative Differenzen liegen innerhalb der Signifikanzgrenzen. Daher besteht statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmbarkeit von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vitro auf dem 1 % Niveau.

Ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ wurde die Leberxanthinoxidase durch Oxipurinol stets stärker gehemmt als die Dünndarmxanthinoxidase. Hätte man den Test auf Ergebnisse aus diesem Konzentrationsbereich angewandt, hätte sich eine signifikant stärkere Hemmung der Leberxanthinoxidase durch Oxipurinol ergeben.

ce) Graphik

Die Werte der Tabellen 12 und 13 (Wirkung von Allopurinol) sind in Abb.9, die Werte der Tabellen 14 und 15 (Wirkung von Oxipurinol) in Abbildung 10 dargestellt.

Auf der x-Achse sind die Inhibitorkonzentrationen logarithmisch aufgetragen, auf der y-Achse die Xanthinoxidase-Restaktivitäten (in Prozent der Kontrollaktivitäten), es handelt sich um eine halblogarithmische Darstellung.

Gezeichnet ist jeweils der Median durch eine Säule, die Restaktivitäten der Dünndarmxanthinoxidase sind durch * gekennzeichnet.

Abb.9: Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung in vitro

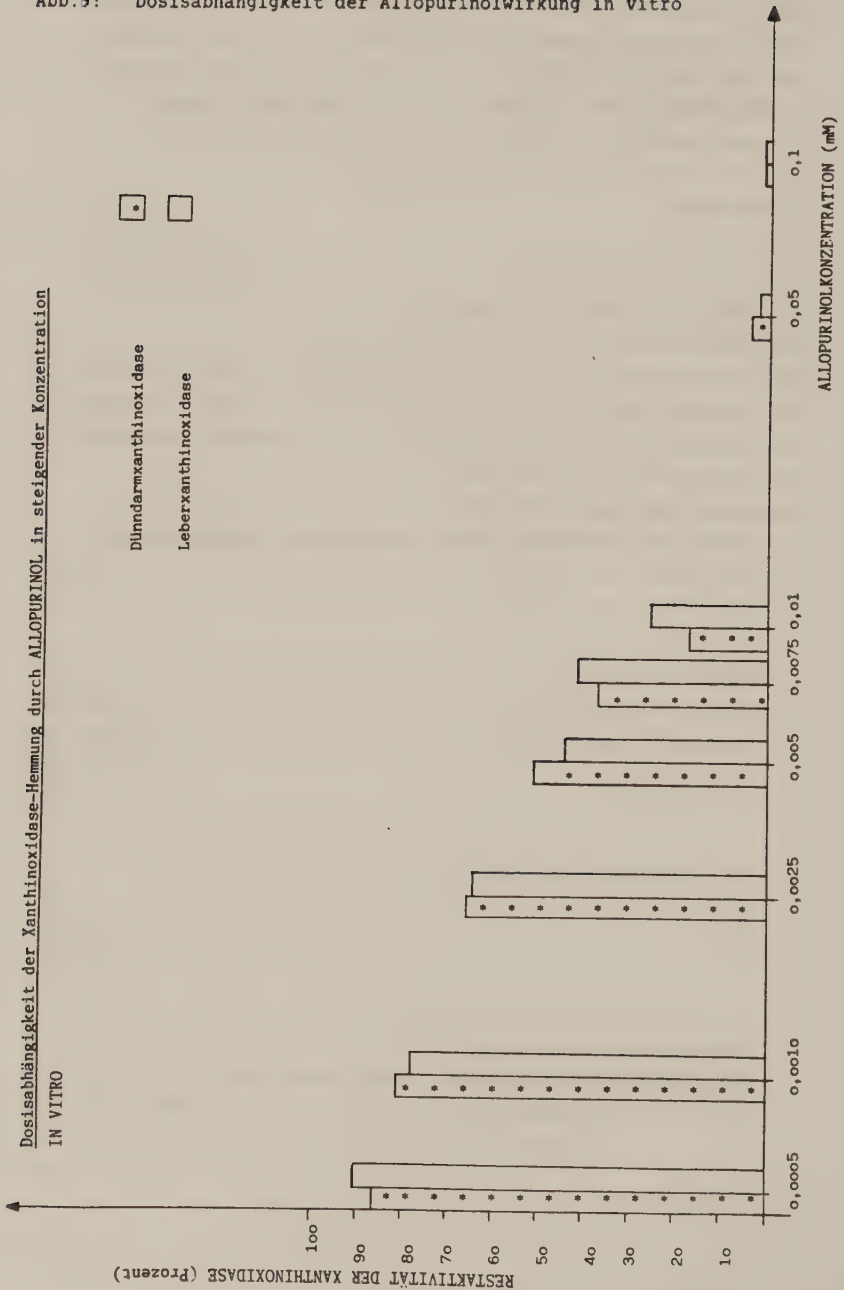
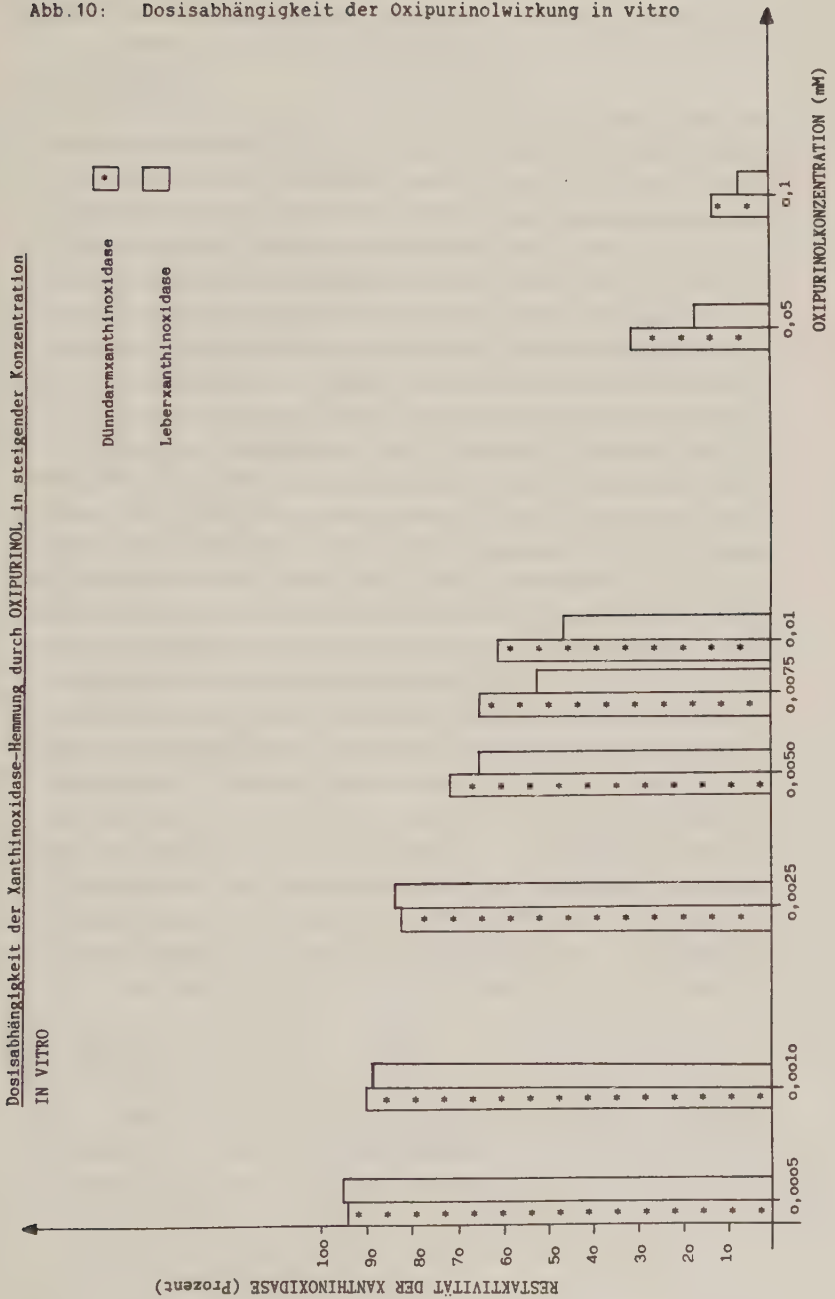


Abb. 10: Dosisabhängigkeit der Oxipurinolwirkung in vitro



cf) Zusammenfassung der Ergebnisse der in vitro Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Allopurinol- und Oxipurinolwirkung

Die Untersuchung der Allopurinolwirkung auf die Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vitro ergab keinen Unterschied zwischen den beiden Organen: aus der halblogarithmischen Darstellung der Dosisabhängigkeit der Xanthinoxidase-Hemmung (Abb. 9) läßt sich entnehmen, daß die Maximalgeschwindigkeit der Xanthinoxidase-Reaktion beider Organe durch eine Allopurinolkonzentration von ca. 0,004 mM zu 50 % gehemmt werden kann. Eine vollständige Hemmung der Xanthinoxidase beider Organe (Restaktivität unter 5 %) konnte mit einer Allopurinolkonzentration von 0,05 mM erzielt werden.

Der Einfluß von Oxipurinol auf die Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vitro war dagegen bei beiden Organen unterschiedlich: eine 50 %ige Hemmung der Maximalgeschwindigkeit der Leberxanthinoxidase erforderte eine Oxipurinolkonzentration von 0,0075 mM, während für die Dünndarmxanthinoxidase eine Konzentration von 0,015 mM erforderlich war. Bei der höchsten eingesetzten Oxipurinolkonzentration von 0,1 mM betrug die Restaktivität der Leberxanthinoxidase noch 8,5 %, die der Dünndarmxanthinoxidase noch 19 %. Aus der halblogarithmischen Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 10) läßt sich entnehmen, daß für eine vollständige Hemmung der Leberxanthinoxidase eine Oxipurinolkonzentration von 0,25 mM, für die Dünndarmxanthinoxidase von 0,5 mM erforderlich wäre.

Der statistische Nachweis eines signifikanten Unterschieds der Hemmbarkeit von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase durch Oxipurinol mit dem Wilcoxon-Vorzeichentest gelang nicht für den Konzentrationsbereich bis 0,005 mM, er ist jedoch bei höheren Konzentrationen nach den vorliegenden Meßergebnissen zu erwarten.

DISKUSSION

a) Zur Methodik.

aa) Zur Präparation der Xanthinoxidase

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Ratte das Enzym Uricase, das Harnsäure zu Allantoin metabolisiert. Die Xanthinoxidasebestimmung anhand der Konzentrationszunahme von Harnsäure erfordert daher eine vollständige Hemmung oder Abtrennung der Uricase. Da die Uricase partikulär gebunden vorliegt, kann sie durch Zentrifugation bei 100.000 x g vollständig abgetrennt werden (15, 24, 10). Vorversuche ergaben, daß die Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität ohne vorherige Dialyse der 100.000 x g-Überstände zu stark streuenden Ergebnissen führt; da die Aktivität der Xanthinoxidase durch Dialysieren kaum beeinflusst wird (27), wurden alle 100.000 x g-Überstände vor Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität dialysiert. Nachdem Oxipurinol pseudoirreversibel an die Xanthinoxidase gebunden wird und nur durch prolongierte Dialyse vom Enzym getrennt werden kann (7, 21), konnten auch die Inkubationen zur Bestimmung der Xanthinoxidase-Restaktivität nach Allopurinol-Gabe in vivo mit 3 Stunden lang bei 0° C dialysierten Überständen durchgeführt werden: Nach Massey u.a. (21) beträgt die Reaktivierung der durch Oxipurinol gehemmten Xanthinoxidase nach 24-stündiger Dialyse bei 0° C weniger als 10 %. Entsprechend war nach Gabe ausreichend hoher Allopurinoldosen in den dialysierten Überständen von Dünndarm und Leber noch eine vollständige Hemmung der Xanthinoxidase zu beobachten (vergl. Tabellen 8-10)

ab) Zur Bestimmung der Xanthinoxidaseaktivität

Die Xanthinoxidase der Ratte liegt in allen Organen als Dehydrogenase (D-Form) vor (E.C.Nr. 1.2.1.37), die Nicotinamidadeninucleotid (NAD) als Elektronenacceptor benötigt (1 und 5). Während der Präparation kommt es durch die Wirkung proteolytischer Enzyme und die Oxidation von Thiolgruppen zu einer teilweisen Umwandlung

in die Oxigenase-Form (O-Form), die mit O_2 als Elektronenakzeptor arbeitet; die Xanthinoxidase der übrigen Rattenorgane wird dagegen vollständig in die Oxigenase-Form überführt (34, 35, 1). Diese unterschiedliche Veränderung des Xanthinoxidase-Moleküls von Leber und Dünndarm während der Enzympräparation kann zu Schwierigkeiten bei der Aktivitätsbestimmung führen, die auf dem unterschiedlichen Bedarf an Elektronenakzeptoren beruhen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde der synthetische Elektronenakzeptor Methylenblau verwendet, der von beiden Enzymformen gleichermaßen benutzt werden kann (27, 40, 3, 4, 34). Der Zusatz von Methylenblau hat außerdem den Vorteil, daß die Xanthinoxidase-Aktivität hierdurch um das 2- bis 5-fache erhöht wird (27, 40, 3, 4, 34, 39), wodurch insbesondere die geringe spezifische Aktivität der Leberxanthinoxidase soweit stimuliert wird, daß eine genaue Messung der Allopurinolwirkung möglich wird. Nachdem in der Literatur bisher keine Untersuchungen über die Wirkung von Allopurinol auf die Xanthinoxidase in Gegenwart von Methylenblau publiziert worden waren, mußte zunächst ausgeschlossen werden, daß Methylenblau mit der Allopurinolwirkung interferiert: drei weitere synthetische Elektronenakzeptoren der Xanthinoxidase, 2,6-Dichlorindophenol, Ferrizyanid und Phenazinmethosulfat, heben die pseudoirreversible Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxipurinol auf: sie oxidieren das reduzierte Molybdän der Elektronentransportkette im Xanthinoxidase-Molekül, an das Oxipurinol gebunden ist; Oxipurinol wird freigesetzt (13, 32, 33). Dieser Effekt war bei Verwendung von Methylenblau nicht zu beobachten: auch in Gegenwart von Methylenblau konnte eine vollständige Hemmung der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase nach Verabreichung von Allopurinol in vivo demonstriert werden (siehe Tabellen 8-10); hieraus folgt, daß Methylenblau keine Freisetzung von Oxipurinol aus seiner pseudoirreversiblen Bindung an die Xanthinoxidase bewirken kann. Der Elektronenübergang auf Methylenblau, das als Elektronen-Carrier zum Sauerstoff fungieren kann (27), erfolgt offensichtlich an einer anderen Stelle der Elektronentransportkette. Der Zeitverlauf der Xanthinoxidase-Hemmung durch Allopurinol und Oxipurinol in vitro unter Zusatz von Methylenblau entspricht dem

Kurvenverlauf mit Sauerstoff als alleinigem Elektronenakzeptor (7, 33, vergl. auch ad)).

ac) Zur Berechnung der Xanthinoxidaseaktivität

Rowe und Wyngaarden (28) sowie Strohmeier u.a. (36) geben die Xanthinoxidaseaktivität in $\Delta E/\text{min.}$ und mg Protein an. Die Umrechnung in die üblichen Aktivitätseinheiten in $\mu\text{mol/min}$ wird von einzelnen Autoren unterschiedlich gehandhabt: Fried und Fried (9) rechnen die Extinktionsänderung über den molaren Extinktionskoeffizienten von Harnsäure um; hierbei bleibt die Extinktion von Xanthin bei 292 nm unberücksichtigt. Auf die unterschiedliche Extinktionsänderung bei der Umwandlung von Hypoxanthin oder Xanthin in Harnsäure hat bereits Kalckar (15) hingewiesen.

Der Differenz-Extinktionskoeffizient für die Umwandlung von Xanthin in Harnsäure wurde von Jorgensen und Poulsen (14) mit $9754/M \times \text{cm}$ (bei pH 8,1 und 292 nm) sowie von Lalanne und Willemot (17) mit $8200/M \times \text{cm}$ (bei pH 8,5 und 298 nm) bestimmt. Stirpe und Della Corte (34) geben den ihren Ergebnissen zugrunde liegenden Umrechnungsfaktor nicht an, so daß unklar bleibt, ob bei der Berechnung der Enzymaktivität die Absorption von Xanthin berücksichtigt wurde.

Den Berechnungen dieser Arbeit wurde der von Jorgensen und Poulsen bestimmte Differenz-Extinktionskoeffizient zugrundegelegt, da er den Bedingungen des Enzymtests (Wellenlänge und pH) exakt entspricht. ad) Zum Kurvenverlauf bei der Bestimmung der Dosisabhängigkeit der Allopurinol- und Oxipurinolwirkung in vitro

ad) Zum Kurvenverlauf bei der Bestimmung der Dosisabhängigkeit der Allopurinol- und Oxipurinolwirkung in vitro

Die Aktivität der Xanthinoxidase wurde aus der maximalen Steigung der Extinktionskurve bestimmt; diese tritt beim ungehemmten Enzym nach einer Startphase mit nur minimaler Aktivität (lag phase) auf und hält an, bis nach weitgehendem Substratverbrauch eine rasche Abnahme der Aktivität auftritt (Vergl. Abb. 3.). Bei der Un-

tersuchung der Xanthinoxidasehemmung durch Allopurinol in vivo ergaben sich ebenfalls lineare Kurven mit geringerer Steigung als bei den Kontrollbestimmungen. Die maximale Extinktionsänderung $\Delta E_{\max}$ hatte den gleichen Betrag wie bei den Kontrollbestimmungen, d.h. Xanthin wurde mit langsamerer Geschwindigkeit, aber vollständig abgebaut.

Bei der Untersuchung der Xanthinoxidasehemmung durch Allopurinol und Oxipurinol in vitro kam es dagegen zu einer kontinuierlichen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit während der Inkubation, so daß insbesondere bei höheren Inhibitorkonzentrationen keine linearen Kurvenabschnitte und kein vollständiger Substratumsatz mehr gefunden wurden. In diesem Fall wurde den Aktivitätsberechnungen die maximale Anfangsgeschwindigkeit zugrunde gelegt (Siehe Abb.8). Dieses Phänomen beruht auf einer pseudoirreversiblen Hemmung der reduzierten Xanthinoxidase durch Oxipurinol (21 und 33, siehe Abb.11):

- Bei gleichzeitiger Inkubation von Xanthinoxidase mit Xanthin und Allopurinol hemmt Xanthin die Oxidation von Allopurinol kompetitiv. Mit der Abnahme der Xanthinkonzentration wird Allopurinol vermehrt zu Oxipurinol oxidiert, das von der hierbei reduzierten Xanthinoxidase pseudoirreversibel gebunden wird. Hierdurch resultiert eine zunehmende Hemmung der Xanthinoxidase.
- Analog kann sich bei gleichzeitiger Inkubation von Xanthinoxidase mit Xanthin und Oxipurinol die pseudoirreversible Verbindung von Oxipurinol und Xanthinoxidase erst ausbilden, wenn die Xanthinoxidase durch Oxidation von Xanthin in die reduzierte Form überführt worden ist.

Bei beiden Inhibitoren wird bei entsprechender Inhibitorkonzentration schließlich eine vollständige Hemmung der Xanthinoxidase erreicht, so daß die totale Extinktionsänderung mit steigender Inhibitorkonzentration abnimmt (Siehe Abb.8)

Bei den in vivo Versuchen dagegen liegt die Xanthinoxidase in Abhängigkeit von der verabreichten Allopurinoldosis bereits zu Inkubationsbeginn zu einem bestimmten Prozentsatz in Form des pseu-

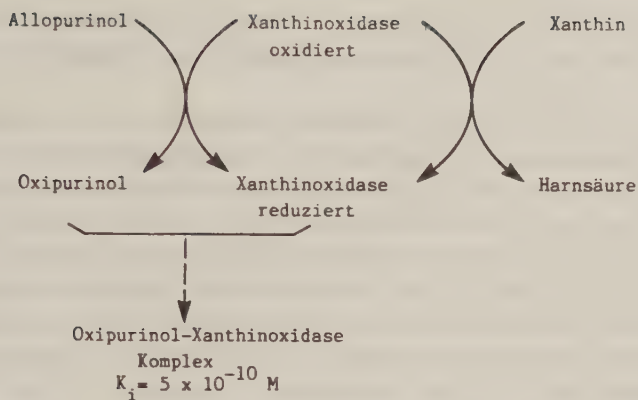


Abb. 11 Bildung des pseudoirreversiblen Oxipurinol-Xanthinoxidase-Komplexes (modifiziert nach 33)

doirreversiblen Oxipurinol-Xanthinoxidase-Komplexes vor, freies Oxipurinol wurde durch Dialyse entfernt. Daher liegt während der Inkubation eine stabile Hemmung der Xanthinoxidase vor, die weder von der Substratkonzentration (Xanthinkonzentration), noch von der Inkubationsdauer abhängig ist. Bei den in vivo Versuchen fanden sich daher - im Gegensatz zu den in vitro Versuchen - lineare Reaktionsabläufe und vollständiger Substratumsatz.

ae) Vergleich der Nativ-Aktivitäten der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase mit entsprechenden Ergebnissen aus anderen Untersuchungen

Für die Leber- und Dünndarmxanthinoxidase der Ratte sind keine Normalwerte in U/g Prot oder U/g Gewebe beschrieben. Ein Vergleich der Xanthinoxidaseaktivität von Leber und Dünndarm der unbehandelten Kontrollratten mit den von anderen Autoren gefundenen Aktivitäten ist schwierig, da z.T. sehr unterschiedliche Versuchsbedingungen verwendet wurden.

Die Durchschnittswerte für die Xanthinoxidaseaktivitäten betrugen für die unbehandelten Ratten (Kontrollen der Tabellen 1 bis 10)

in der vorliegenden Arbeit $0,99 \pm 0,21$ U/100 mg Protein $\times$ min in der Leber und $2,11 \pm 0,79$ U/100 mg Protein $\times$ min im Dünndarm.

Stirpe und Della Corte (34) fanden in der Rattenleber $0,45 \mu\text{Mol}$ und im Dünndarm $0,87 \mu\text{Mol}$ gebildete Harnsäure/100 mg Protein $\times$ min. Bezogen auf das Gewebegewicht fanden sie in der Rattenleber $0,05 \mu\text{Mol}$ und im Rattendünndarm $0,051 \mu\text{Mol}$ gebildete Harnsäure in 100 mg Gewebe und Minute. Die Präparation erfolgte bei dieser Arbeit in Anlehnung an Rowe und Wyngaarden (28). Die Autoren verwendeten die gleichen Inkubations- und Meßbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit ($0,136$ M Tris-HCl pH 8,1, $60 \mu\text{M}$ Xanthin, $33 \mu\text{M}$ Methylenblau), gaben jedoch den Umrechnungsfaktor für die Berechnung des molaren Umsatzes aus Delta E_{292} nicht an.

Levinson und Chalker (18) bestimmten die Xanthinoxidase radiochemisch. Auf den Zusatz von Methylenblau wurde verzichtet, offensichtlich aufgrund der höheren Empfindlichkeit dieser Methode. Die Substratkonzentration wurde mit $400 \mu\text{M}$ erheblich über die bei der photometrischen Bestimmung mögliche Konzentration erhöht, auf das 10-fache des von den Autoren berechneten K_M -Wertes von $40 \mu\text{M}$ bzw. auf das 100-fache des von Elion u.a. angegebenen K_M Werts von $4 \mu\text{M}$ (7, 8). Die hohe Substratkonzentration garantiert auch bei langer Inkubationszeit und hoher Xanthinoxidaseaktivität eine konstante Substratsättigung. Hierauf kann beim photometrischen Test verzichtet werden, da im Gegensatz zur radiochemischen Methode nur die Maximalgeschwindigkeit der Xanthinoxidase-Reaktion und nicht der Gesamtumsatz über eine längere Inkubationszeit bestimmt wird. Levinson und Chalker aktivierten ihre Enzympräparationen durch eine 40-minütige Vorinkubation bei 37°C , wodurch eine 4-fach höhere Aktivität erreicht wurde. Die Aktivitätsmessungen wurden bei 37°C durchgeführt. Gegenüber der Messung bei 25°C wird hierdurch eine 2,08-fach höhere Aktivität erreicht (9). In der Rattenleber fanden Levinson und Chalker eine Xanthinoxidaseaktivität von $0,46 \mu\text{mol}/100$ mg Protein $\times$ min.

Die gegenüber der vorliegenden Arbeit ca. 16-fach niedrigere Xanthinoxidase-Aktivität (wenn man den Vor-Inkubationseffekt und den

Temperaturkonversions-Faktor nicht berücksichtigt) ist nur zum Teilauf das Fehlen von Methylenblau zurückzuführen.

Strohmeyer u.a. (36) untersuchten die Xanthinoxidase von Rattenleber und -dünndarmmucosa. Ihre Enzympräparationen wurden nur mit 25.000 x g zentrifugiert, enthielten somit Organellen, wurden nicht dialysiert, aber bei Nacht auf -20°C eingefroren. Bei der Aktivitätsbestimmung wurde kein Methylenblau zugesetzt. Der Puffer war 0,1 M Pyrophosphat, pH 8,3.

Strohmeyer u.a. fanden in der Rattenleber 220 Delta E/min x 100 mg Protein und im Rattendünndarm etwa 2250 Delta E/min x 100 mg Protein.

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich 320 Delta E/min x 100 mg Protein in der Leber und 680 Delta E/min x 100 mg Protein im Dünndarm, wobei allerdings der gesamte Querschnitt des Dünndarms untersucht wurde. Die für die Bestimmung ohne Methylenblau erstaunlich hohe Aktivität erklärt sich durch das Einfrieren auf -20°C, das die Aktivität um das 5- bis 7-fache erhöht (3). Durch die Untersuchung der isolierten Mucosa erzielt man eine höhere spezifische Aktivität, da die Xanthinoxidase ausschließlich in der Mucosa lokalisiert ist.

Krenitsky u.a. (16) maßen 0,070 $\mu\text{mol/min}$ Xanthinoxidase-Aktivität in 100 mg Rattendünndarmgewebe und 0,050 $\mu\text{mol/min}$ in 100 mg Lebergewebe der Ratte. Der Artikel enthält keine Angaben über die Versuchsbedingungen.

Hashimoto (10) fand 0,024 $\mu\text{mol/min}$ Xanthinoxidaseaktivität in 100 mg Rattenleber, 0,083 $\mu\text{mol/min}$ in 100 mg Rattenduodenum und

0,071 $\mu\text{mol/min}$ in Rattenjejunum. Diese Untersuchungen wurden bei 30°C durchgeführt.

Die etwa um das 10-fache geringeren Aktivitäten von Krenitsky und Hashimoto erklären sich durch den Bezug der Xanthinoxidaseaktivität auf 100 mg Gewebe statt auf 100 mg Protein wie in der vorliegenden Arbeit.

Die Xanthinoxidaseaktivitäten in Leber und Dünndarm der unbehan-

delten Ratten unterscheiden sich von denen anderer Autoren. Nach Berücksichtigung der differierenden Versuchsbedingungen liegen sie größtenteils in ähnlicher Höhe.

b) Zur Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vivo

Oral verabreichtes Allopurinol wird beim Menschen zu etwa 80 % absorbiert und zu 70-80 % zu Oxipurinol oxidiert (6). Oxipurinol hat beim Menschen eine Serumhalbwertszeit von 12-30 Stunden (38 und 2) und akkumuliert daher bei kontinuierlicher Allopurinol-Einnahme. Der volle Effekt einer konstanten Tagesdosis von Allopurinol wird daher erst nach 3-5 Tagen erreicht (6).

Strohmeyer u.a. (36) konnten nach 10-tägiger Gabe einer hohen Allopurinoldosis (45 mg/kg KG) bei Ratten keine Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase und nur eine geringe Hemmung der Leberxanthinoxidase nachweisen. Dieser Unterschied beruht auf einer kürzeren Serumhalbwertszeit von Oxipurinol bei der Ratte. Während Oxipurinol beim Menschen aufgrund einer Serumhalbwertszeit von 18 bis 30 Stunden akkumuliert und daher der wirksame Hauptmetabolit des Allopurinols ist, wird es bei der Ratte rasch ausgeschieden. Aus den von Nelson u.a. (23) angegebenen Serumspiegeln nach intravenöser Injektion von Allopurinol errechnet sich für Oxipurinol eine Serumhalbwertszeit von weniger als einer Stunde.

Um die Hemmung von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase vergleichen zu können, mußte daher zunächst die Zeit-Wirkungsbeziehung von Allopurinol bei der Ratte bestimmt werden. Die Messung der Xanthinoxidase-Aktivität in Dünndarm und Leber 2, 5, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden nach oraler Allopurinol-Verabreichung zeigte nach 2 Stunden eine vollständige Hemmung der Leberxanthinoxidase (0,2 % Restaktivität) und eine sehr starke Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase (11,5 % Restaktivität). 5 Stunden nach Applikation von Allopurinol hatte die Hemmung nur gering abgenommen (4,7 % bzw. 18,5 % Restaktivität; im weiteren Zeitverlauf nahm die Hemmung insbesondere nach dem 12-Stunden-Wert rasch ab und war 24 Stunden nach Allopurinol-Applikation völlig verschwunden. Für den

Aktivitätsvergleich von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase wurde daher das Intervall von 2 Stunden zwischen Applikation von Allopurinol und Bestimmung der Xanthinoxidase gewählt, aus technischen Gründen des Versuchsablaufs erfolgte die Organentnahme exakt 2,5 Stunden nach Allopurinol-Applikation.

Die Ergebnisse weisen auf eine im Vergleich zum Menschen kürzere Halbwertszeit von Oxipurinol bei der Ratte hin; Oxipurinol akkumuliert nicht bei Zufuhr konstanter Dosen von Allopurinol über mehrere Tage.

c) Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase der Ratte in vivo

Bei der Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung auf die Xanthinoxidase von Leber und Dünndarm der Ratte hatte sich bei der applizierten Dosis von 30 mg/kg KG gezeigt, daß die Leberxanthinoxidase stärker gehemmt wurde als die Dünndarmxanthinoxidase. Dieser Befund war überraschend, da nach den Theorien über den Mechanismus der unterschiedlichen Wirkung von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote (siehe Einleitung) eine stärkere Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase erwartet worden war. Die Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung bestätigte diesen Befund: bei allen Allopurinoldosen zwischen 0,3 und 10 mg/kg KG wurde die Leberxanthinoxidase stärker gehemmt als die Dünndarmxanthinoxidase (vergl. Abb.7). Eine vollständige Hemmung der Leberxanthinoxidase wurde bereits mit einer Dosis von etwa 2 mg/kg KG, eine vollständige Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase erst mit 30 mg/kg KG erzielt.

Bei dieser Dosis hatte die Dünndarmxanthinoxidase in den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung noch eine Restaktivität von 11,5 % gezeigt (s.o.). Dieser Unterschied dürfte mit einer Änderung der Applikationsform zu erklären sein: in den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Allopurinolwirkung wurde Allopurinol nur durch Rühren in Carboxymethylcellulose suspendiert, in den Versuchen zur Dosisabhängigkeit der Allopurinolwirkung da=

gegen mit dem Sonifier fein dispers verteilt. Hierdurch dürfte die Absorption erleichtert worden sein.

Um zu klären, ob die stärkere Hemmung der Leberxanthinoxidase auf pharmakokinetischen Mechanismen oder einer unterschiedlichen Hemmbarkeit von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase beruht, wurde die Hemmung beider Enzyme durch Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten Oxipurinol in vitro untersucht.

d) Hemmbarkeit der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase der Ratte durch Allopurinol und Oxipurinol in vitro

In vitro wurden Leber- und Dünndarmxanthinoxidase durch Allopurinol gleich stark gehemmt. Die Maximalgeschwindigkeit der Xanthinoxidase-Reaktion beider Organe kann durch eine Allopurinolkonzentration von ca. 0,004 mM zu 50 % gehemmt werden. Bei einer Allopurinolkonzentration von 0,05 mM fand sich eine Restaktivität der Leberxanthinoxidase von 4,6 % sowie der Dünndarmxanthinoxidase von 4,4 %, bei einer Konzentration von 0,1 mM Allopurinol waren Leber- und Dünndarmxanthinoxidase vollständig gehemmt.

Oxipurinol zeigte demgegenüber einen 5- bis 10-fach schwächeren Einfluß auf die Xanthinoxidase beider Organe und hemmte außerdem in Konzentrationen von 0,005-0,1 mM die Leberxanthinoxidase stärker als die Dünndarmxanthinoxidase: bei einer Oxipurinolkonzentration von 0,1 mM betrug die Restaktivität der Leberxanthinoxidase 8,5 %, die der Dünndarmxanthinoxidase 19 %. Dieser in vitro nachweisbare Unterschied der Oxipurinolwirkung auf die Leber- und Dünndarmxanthinoxidase dürfte die unterschiedliche Hemmbarkeit der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vivo erklären, da auch bei der Ratte Oxipurinol den Hauptmetaboliten von Allopurinol darstellt (23).

e) Zum unterschiedlichen Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote des Menschen

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren die Beobachtungen von

Zöllner und Gröbner (41) sowie von Löffler u.a. (19), wonach die endogene Uratquote bei purinfrei ernährten Versuchspersonen auch durch hohe Allopurinoldosen nicht unter 40 % zu senken war und die anschließende Zulage von RNS zu keinem Anstieg der Harnsäureausscheidung führte (vergl. Einleitung). Somit schien eine völlige Eliminierung der exogenen im Gegensatz zur endogenen Uratquote möglich zu sein. Es wurde vermutet, daß diesem Phänomen eine vollständige Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase zugrundeliegt, die durch eine hohe Allopurinolkonzentration am Ort der Absorption zustande kommen könnte. Die Leberxanthinoxidase wäre demgegenüber nicht vollständig inhibierbar und könnte weiterhin endogen gebildete Purine zu Harnsäure abbauen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen diesen Erklärungsversuch: bei der Ratte wurde die Leberxanthinoxidase durch oral verabreichtes Allopurinol stärker gehemmt als die Dünndarmxanthinoxidase, was nach in vitro Versuchen auf eine stärkere Hemmbarkeit der Leberxanthinoxidase durch Oxipurinol zurückzuführen sein dürfte. Sowohl bei den in vivo, als auch bei den in vitro Versuchen war die Leberxanthinoxidase mit Allopurinol- bzw. Oxipurinolkonzentrationen vollständig hemmbar, bei denen die Dünndarmxanthinoxidase noch eine deutliche Restaktivität besaß.

Man muß daher wohl andere Mechanismen postulieren, um die unvollständige Eliminierbarkeit der endogenen im Gegensatz zur exogenen Uratquote zu erklären:

Allopurinol kann nach oraler Gabe von 300 mg Spitzenkonzentrationen im Serum von 0,015 mM erreichen (2), wodurch eine vollständige Hemmung der Leberxanthinoxidase ($K_i=0,00019$ mM, nach 7 und 8) bewirkt werden sollte. Aufgrund der kurzen Serumhalbwertszeit von Allopurinol (1-2 Stunden, nach 7, 8 und 2) läßt seine Hemmwirkung jedoch rasch nach. Der aus Allopurinol entstehende Hauptmetabolit Oxipurinol akkumuliert aufgrund seiner Serumhalbwertszeit von 12-30 Stunden und erreicht bei üblicher Dosierung (300 mg/die) und normaler Nierenfunktion Serumspiegel zwischen 0,05 und 0,1 mM (38, 2). Oxipurinol ist ein ca. 5-fach schwächerer Hemmer der Xanthinoxidase als Allopurinol ($K_i=0,0011$ mM nach 7

und 8), die erreichbaren Serumspiegel liegen jedoch um das 50-bis 100-fache über dem K_1 -Wert und sollten eine über 24 Stunden anhaltende vollständige Hemmung der Xanthinoxidase ermöglichen. Offensichtlich können jedoch die in vitro ermittelten Hemmkonzentrationen bzw. K_1 -Werte nicht auf die Verhältnisse in vivo übertragen werden: In vivo werden höchstwahrscheinlich wesentlich höhere Oxipurinolkonzentrationen für eine vollständige Hemmung der Xanthinoxidase benötigt. Die Höhe des Oxipurinolspiegels ist jedoch bei normaler Nierenfunktion limitiert, da bei steigenden Allopurinoldosen die Oxidation von Allopurinol zu Oxipurinol durch die Xanthinoxidase zunehmend gehemmt wird. Es wird daher vermehrt unmetabolisiertes, nur kurz wirksames Allopurinol und Allopurinol-1-Ribosid ausgeschieden, das keine Hemmwirkung auf die Xanthinoxidase besitzt: Während bei einer Allopurinol-Standarddosis (300 mg/die) die Urinmetaboliten zu jeweils etwa 10 % aus unmetabolisiertem Allopurinol und Allopurinol-1-Ribosid bestehen, betrug der Anteil von unmetabolisiertem Allopurinol bei einem Kind, das 1200 mg Allopurinol/die erhielt, 33 % (6). Bei Versuchen mit Schweinen fanden Simmonds u.a. (30) bei einer Dosis von 450 mg Allopurinol/kg KG folgende Zusammensetzung der Urinmetaboliten: Oxipurinol 13 %, unmetabolisiertes Allopurinol 33 %, Allopurinol-1-Ribosid 54 %.

Wie die vorliegende Untersuchung gezeigt hat, ist zumindest bei der Ratte eine vollständige Hemmung der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vivo möglich. Hierzu wurde eine Dosis von 30 mg/kg KG benötigt; die vollständige Hemmung bildet sich jedoch nach einigen Stunden wieder zurück, so daß zur vollständigen Eliminierung der endogenen Uratquote hohe Dosen von Allopurinol wiederholt über den Tag verteilt gegeben werden müßten.

Die exogene Uratquote ist demgegenüber bereits mit üblichen Allopurinoldosen weitgehend zu eliminieren. Dieses Phänomen könnte zum Teil mit den Beobachtungen von Jezewska (12) erklärbar sein: Demnach stellt Hypoxanthin das gegenüber Xanthin deutlich bevorzugte Substrat für die Xanthinoxidase dar. Inkubiert man Hypoxanthin mit Xanthinoxidase, so wird Hypoxanthin zunächst nur zu Xan-

thin abgebaut, das vom Enzym abdiffundiert und sich in der Inkubationslösung anreichert. Zur Harnsäurebildung aus Xanthin kommt es erst, wenn die Hypoxanthinkonzentration gegenüber der Xanthinkonzentration deutlich abgenommen hat.

Überträgt man diesen Mechanismus auf die geschilderten Ernährungsversuche, wo bei gleichzeitiger Verabreichung von RNS, d.h. von Adenosinmonophosphat (AMP) + Guanosinmonophosphat (GMP) und Allopurinol eine massive Zunahme der Hypoxanthin- und Xanthinausscheidung gemessen wurde, so kann man annehmen, daß die Harnsäurebildung aus Xanthin durch das in großer Menge aus dem AMP-Abbau anfallende Hypoxanthin verhindert wurde.

Versuche von Reiter u.a.(25) haben allerdings gezeigt, daß auch nach Gabe von Guanosin oder GMP die Harnsäurebildung durch Allopurinol fast vollständig unterdrückt wird. Da in diesem Fall nur eine minimale Hypoxanthinausscheidung zu beobachten war, ist die Hemmung der Harnsäurebildung aus exogenen Purinen mit dem Mechanismus der Substratpräferenz allein offensichtlich nicht zu erklären.

Vielmehr muß man annehmen, daß die nichtkompetitive Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxipurinol (6) die Eliminierung der exogenen Uratquote bewirkt: Oxipurinol wird pseudoirreversibel an die Xanthinoxidase gebunden und kann auch durch hohe Substratkonzentrationen (Hypoxanthin oder Xanthin) nicht aus seiner Bindung verdrängt werden. Die Xanthinoxidase von Leber und Dünndarm des Menschen wird bereits durch übliche Allopurinoldosen (300 mg/die) so stark gehemmt, daß die verbleibende Restaktivität nicht ausreicht, um die endogen anfallenden Abbauprodukte des Purinstoffwechsels vollständig zu Harnsäure zu oxidieren: bereits unter purinfreier Diät wird ja die Harnsäureausscheidung durch Allopurinol deutlich reduziert und zumindest teilweise durch eine Mehrausscheidung der Harnsäurevorstufen Hypoxanthin und Xanthin ersetzt. Verabreicht man nun exogene Purine, so kann das aus diesen vermehrt entstehende Hypoxanthin und Xanthin die pseudoirreversible Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxipurinol nicht aufheben. Die Restaktivität der Xanthinoxidase bleibt daher auch bei hohem Substratangebot unverändert niedrig, so daß es zu keiner vermehrten Harnsäurebildung bei Verabreichung exogener Purine kommen kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Zöllner und Gröbner beobachteten eine unterschiedliche Wirkung von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote: Während die endogene Uratquote nur um 60 % reduziert werden konnte, ließ sich die exogene Uratquote durch Allopurinol vollständig eliminieren. Es sollte an Ratten untersucht werden, ob diesem Phänomen eine stärkere Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase im Vergleich zur Leberxanthinoxidase zugrunde liegt.

Nachdem es bisher nicht gelungen war, eine Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase der Ratte in vivo durch Allopurinol zu zeigen, wurde zunächst die Zeit-Wirkungsbeziehung von Allopurinol auf die Leber- und Dünndarmxanthinoxidase der Ratte nach oraler Applikation studiert. Eine vollständige Hemmung der Leber- und Dünndarmxanthinoxidase konnte 2 Stunden nach oraler Verabreichung von Allopurinol gezeigt werden. Diese Hemmung bildete sich jedoch rasch zurück und war nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Allopurinol hat somit bei der Ratte eine wesentlich kürzere Wirkungsdauer als beim Menschen.

Die Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Allopurinol auf die Leber- und Dünndarmxanthinoxidase in vivo ergab eine stärkere Hemmung der Leberxanthinoxidase im Vergleich zur Dünndarmxanthinoxidase: Die Leberxanthinoxidase war mit 2 mg Allopurinol/kg KG, die Dünndarmxanthinoxidase erst mit 30 mg/kg KG vollständig hemmbar (Restaktivität unter 5 %). Dieser Unterschied konnte durch in vitro Versuche geklärt werden: Während Allopurinol die Xanthinoxidase von Leber und Dünndarm gleich stark hemmte, führte sein schwächer wirksamer Hauptmetabolit Oxipurinol zu einer stärkeren Hemmung der Leberxanthinoxidase.

Sämtliche Bestimmungen der Xanthinoxidase-Aktivität wurden im Gegenwart von Methylenblau als spezifischem Elektronenakzeptor durchgeführt. Es konnte hierbei erstmals gezeigt werden, daß Methylenblau, im Gegensatz zu anderen synthetischen Elektronenakzeptoren (2,6-Dichlorphenolindophenol, Ferrizyanid, Phenazinmethosulfat) die pseudoirreversible Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxipurinol nicht aufheben kann.

Die unvollständige Eliminierbarkeit der endogenen Uraquote dürfte nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht auf einer fehlenden Hemmbarkeit der Leberxanthinoxidase beruhen. Wahrscheinlich lassen sich aufgrund von Mechanismen des Allopurinolstoffwechsels keine ausreichend hohen Oxipurinolspiegel erreichen, um eine langdauernde vollständige Hemmung von Leber- und Dünndarmxanthinoxidase zu bewirken.

Die völlige Eliminierung der exogenen Uratquote durch Allopurinol beruht nicht auf einer stärkeren Hemmung der Dünndarmxanthinoxidase im Vergleich zur Leberxanthinoxidase. Sie könnte mit einer bevorzugten Oxidation von Hypoxanthin gegenüber Xanthin oder mit der nichtkompetitiven Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxipurinol zu erklären sein.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Batelli, M., G., Della Corte, E., Stirpe, F.:
Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat.
Biochem. J. 126, 747-749 (1977)

- 2) Breithaupt, H., Tittel, M.:
Kinetics of allopurinol after single intravenous and oral doses.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 22, 77-84 (1982)

- 3) Della Corte, E., Stirpe, F.:
Regulation of xanthine oxidase in rat liver: modification of the enzyme activity of rat liver supernatant on storage at -20°C.
Biochem. J. 108, 349-351 (1968)

- 4) Della Corte, E., Stirpe, F.:
The regulation of rat liver xanthine oxidase: activation by proteolytic enzymes.
Febs letters 2, Nr. 2, 83-84 (1968)

- 5) Della Corte, E., Stirpe, F.:
The regulation of rat liver xanthine oxidase.
Biochem. J. 126, 739-745 (1972)

- 6) Elion, G.B.:
Allopurinol and other inhibitors of urate synthesis.
in "Uric Acid"
Kelley, W.N., Weiner I.M. (eds.)
Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 51, 485-514, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1978)

- 7) Elion, G.B.:
Enzymatic and metabolic studies with allopurinol.
Ann. Rheum. Diseases. 25, 608-614 (1966)

8) Elion, G.B., Kovensky, A., Hitchings, G.A., Metz, E.,
Rundles, R.W.:

Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase.

Biochem. Pharmacol. 15, 863-880 (1966)

9) Fried, R., Fried, L.W.:

Xanthine oxidase (xanthine dehydrogenase).

in: Bergmeyer, H.U. (edit.)

Methods of enzymatic analysis, vol III, 210-216

3rd edit., Verlag Chemie, Weinheim / Bergstraße, 1974

10) Hashimoto, S.:

A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate.

Anal. Biochem. 62, 426-435 (1974)

11) Heaf, D.J., Davies, J.I.:

The effect of RNA supplementation of rat diets on the composition of body fluids.

Brit. J. Nutr. 36, 381-402 (1976)

12) Jezewska, M.M.:

Xanthine accumulation during hypoxanthine oxidation by milk xanthine oxidase.

Eur. J. Biochem. 36, 385-390 (1973)

13) Johns, D.G.:

Anomalous differential effects of 4-hydroxy pyrazolo(3,4-d)-pyrimidine on electron transfer from xanthine oxidase to molecular oxygen and to acceptor dyes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 197-202 (1968)

14) Jorgensen, S., Poulsen, H.E.:

Enzymic determination of hypoxanthine and xanthine in human plasma and urine.

Acta pharmacol. et toxicol. 11, 223-243 (1955)

15) Kalckar, H.M.:

Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes III. Studies of the enzymes of purine metabolism.

J. Biol. Chem. 167, 461-475 (1947)

16) Krenitsky, T.A., Tuttle, J.V., Cattau, E.L., Wang, P.:

A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase.

Comp. Biochem. Physiol. 49 B, 687-703 (1974)

17) Lalanne, M., Willemot, J.:

Xanthine oxidase from mouse skeletal muscle. Purification and kinetic studies.

Int. J. Biochem. 6, 479-484 (1975)

18) Levinson, D.J., Chalker, D.:

Rat hepatic xanthine oxidase activity - age and sex specific differences.

Arthr. Rheum. 23, 77-82 (1980)

19) Löffler, W., Gröbner, W., Zöllner, N.:

Über die Hemmung der endogenen Harnsäuresynthese durch Allopurinol.

Verh. dtsch. Ges. f. Inn. Med. 87, 53-57 (1981)

20) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, R.L., Randall, R.J.:

Protein measurements with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-273 (1951)

21) Massey, V., Komai, H., Palmer, G., Elion, G.D.:

On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo (3,4-d)pyrimidines.

J. Biol. Chem. 245, 2837-2844 (1970)

22) Meikleham, V., Wells, I.C., Richert, D.A., Westerfeld, W.W.:

Liver esterase and xanthine oxidase during protein depletion.

J. Biol. Chem. 192, 651-662 (1951)

23) Nelson, D.J., Bugge, C.J.L., Krasny, H.C., Elion, G.B.:

Formation of nucleotides of (6-¹⁴C)allopurinol and (6-¹⁴C)oxipurinol in rat tissues and effects on uridine nucleotide pools.

Biochem. Pharmacol. 22, 2003-2033 (1973)

24) Praetorius, E.:

An enzymatic method for the determination of uric acid by ultra-violet spectrophotometry.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1, 220-230 (1949)

25) Reiter, S., Löffler, W., Gröbner, W., Zöllner, N.:

Influence of dietary purines on the metabolism of allopurinol in man.

Wld. Rev. Nutr. Diet. 43, 187-191 Karger Verlag, Basel (1984)

26) Reiter, S., Zöllner, N.:

Pathophysiologie der Hyperurikämie und Gicht.

Akt. Endokrin. Stoffw. 3, 149-156 (1982)

27) Richert, D.A., Edwards, S., Westerfeld, W.W.:

On the determination of liver xanthine oxidase and the respiration of rat liver homogenates.

J. Biol. Chem. 181, 255-271 (1949)

28) Rowe, P.B., Wyngaarden, J.B.:

The mechanics of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels.

J. Biol. Chem. 241, 5571-5576 (1966)

29) Simmonds, H.A., Hatfield, P.J., Cameron, J.S., Jones, A.S., Cadenhead, A.:

Metabolic studies of purine metabolism in the pig during oral administration of guanine and allopurinol.

Biochem. Pharmacol. 22, 2537-2551 (1973)

30) Sorensen, L.B.:

The elimination of uric acid in man studied by means of ^{14}C -labeled uric acid.

Scan. J. Clin. Lab. Invest. 12, Suppl 54, 1-214 (1960)

31) Sorensen, L.B.:

Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid.

Arthr. Rheum. 8, 694-706 (1965)

32) Spector, T., Johns, D.G.:

Oxidation of 4-hydroxypyrazolo(3,4-d)pyrimidine by xanthine oxidase: the route of electron transfer from substrate to electron acceptor dyes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 1039-1044 (1968)

33) Spector, T.:

Inhibition of urate production by allopurinol.

Biochem. Pharmacol. 26, 355-358 (1977)

34) Stirpe, F., Della Corte, E.:

The regulation of rat liver xanthine oxidase.

J. Biol. Chem. 244, 3855-3866 (1969)

35) Stirpe, F., Della Corte, E.:

The regulation of rat liver xanthine oxidase: conversion of type D (dehydrogenase) into type O (oxidase) by a thermolabile factor, and reversibility by dithioerythritol.

Biochem. Biophys. Acta 212, 195-197 (1970)

36) Strohmeyer, G., Cheranai, O., Goebell, H.:

Die Bedeutung der Xanthinoxidase für den Eisenstoffwechsel.

Z. f. ges. exp. Med. 155, 74-86 (1971)

37) Überla, K.:

Biomathematik, Erläuterungen und Lernhilfen zum Gegenstandskatalog.

Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathik der Ludwig-Maximilians-Universität München (1976)

38) Walter-Sack, I., Gröbner, W., Zöllner, N.:

Verlauf der Oxipurinol-Spiegel im Plasma nach akuter und chronischer Gabe von Allopurinol in unterschiedlichen galenischen Zubereitungen.

Arzneim.-Forsch./Drug Res. 29, 839-842 (1979)

39) Watts, R.W.E., Watts, J., Seegmiller, J.E.:

Xanthine oxidase in human tissues and its inhibition by allopurinol.

J. Lab. Clin. Med. 66, 688-697 (1966)

40) Westerfeld, W.W., Richert, D.A.:

The determination of xanthine oxidase in rat liver and intestine.

J. Biol. Chem. 199, 393-405 (1952)

41) Zöllner, N., Gröbner, W.:

Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote.

Eur. J. Pharmacol. 3, 56-58 (1970)

42) Zöllner, N., Griebisch, A.:

Diet and gout.

in: Sperling, O. e.a. (Eds.)

Purine Metabolism in Man, Vol. 41 B, 435-442

Plenum Publishing Corp., New York 1974

LEBENS LAUF

Matthias Gottfried Münzer,

geboren am 26. August 1954 in Großen-Buseck, Kreis Gießen (Hessen) als Sohn des Oberstudienrats Oskar Münzer und seiner Ehefrau Gisela, geb. Jung, Kindergärtnerin und Kosmetikerin.

Einschulung im Heimatort 1960, ab 1962, nach Umzug der Eltern nach Spanien, Besuch der Deutschen Schule Madrid. 1969 Rückkehr und Besuch des Landgraf-Ludwig-Gymnasiums in Giessen bis 1973. Dann wiederum Umzug nach Madrid, dort 1974 Abitur.

Beginn des Medizinstudiums im Mai 1975 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Approbation im Dezember 1981.

Von August 1982 - Oktober 1983 Truppenarzt in der Marinesanitätsstaffel Wilhelmshaven.

Von Januar 1984 bis März 1985 Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im Zentralklinikum Augsburg (Direktor Prof. Dr. J. Eckart).

Seit April 1985 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie der Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor Prof. Dr. V. Becker).

DANKSAGUNGEN

Ich bedanke mich

bei Herrn Prof. Dr. W. Gröbner und Herrn Prof. Dr. N. Zöllner für die Themenstellung und das Referat,

bei Herrn Dr. S. Reiter für Anregungen, Kritik und Korrekturen der Arbeit,

sowie bei Herrn G. Schmid für die Überlassung des Textverarbeitungssystems, mit dem die Arbeit geschrieben wurde.

